

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 518**

51 Int. Cl.:

C12P 21/06 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2005 E 11151039 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2339015**

54 Título: **Métodos para modificar las tasas de producción de proteínas**

30 Prioridad:

31.03.2004 US 558239 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.06.2018

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

**BANNISH, GREGORY;
GILES-KOMAR, JILL y
RYCZYNY, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 673 518 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

Métodos para modificar las tasas de producción de proteínas**Descripción**5 **Campo de la invención**

[0001] Esta invención está relacionada con unos métodos para modificar la tasa de secreción celular de una proteína.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] Normalmente, la producción de proteínas -como anticuerpos- a gran escala se basa en la secreción de proteínas a partir de una línea de producción de células cultivadas. Las proteínas secretadas que se producen mediante células cultivadas pueden recuperarse del medio de cultivo celular circundante y purificarse fácilmente.

15 [0003] La tasa de secreción celular de proteínas es un parámetro importante que influye en la producción y la purificación de las proteínas secretadas de un biorreactor u otro sistema. En general, pueden obtenerse cosechas o producciones de proteínas más purificadas cuando la tasa de secreción celular es relativamente elevada. A la inversa, si la tasa de secreción celular es demasiado baja, la purificación de proteínas tal vez no sea factible.

20 [0004] Una de las estrategias para solucionar el problema de las células con una secreción baja ha sido aislar las células subclonadas con una secreción alta de una población de células con una secreción baja. Normalmente, esto requiere de mucho tiempo y de series intensivas de dilución limitante en serie, rastreo y selección de líneas celulares de secreción alta. De manera alternativa, se generan líneas celulares completamente nuevas y que producen la proteína de interés con la esperanza de que estas nuevas líneas celulares sean líneas con una secreción elevada.

25 [0005] Cada una de las estrategias anteriores para obtener líneas celulares con una secreción alta presenta limitaciones. Por ejemplo, la identificación de líneas celulares con una secreción alta mediante el subclonaje a partir de una población de células con una secreción baja se ve limitada por la relativa escasez de células con una secreción alta en dicha población, así como por las grandes cantidades de tiempo y trabajo que se requieren para identificar cualquier célula con una secreción alta.

30 [0006] Además, la obtención de nuevas líneas celulares que produzcan el anticuerpo o la proteína de interés se ve limitada por la posibilidad de que las nuevas líneas celulares no tengan una secreción elevada y por el considerable esfuerzo que se requiere para regenerar las células que producen anticuerpos e identificar las células con una secreción alta. En algunos casos, solo pueden obtenerse líneas celulares con una secreción baja debido al plegamiento incorrecto de proteínas dentro del retículo endoplasmático (RE) de las células, lo cual provoca una tasa de secreción menor.

35 [0007] Por todo ello, existe una necesidad de hallar métodos eficaces para modificar la tasa de secreción celular de una proteína.

Breve descripción de las ilustraciones45 **[0008]**

La Figura 1 (Fig. 1) muestra los niveles de transcripción del gen de la UPR (o los niveles de transcritos génicos de la UPR) en células que secretan mAbs en grandes proporciones.

50 La Figura 2 muestra los niveles de transcripción del gen de la UPR en células en fase de crecimiento estático. La Figura 3 muestra una comparación de los niveles de transcripción del gen de la UPR en líneas celulares de mieloma parentales.

La Figura 4 muestra los niveles de transcripción del gen de la UPR en líneas celulares con una secreción alta en relación con la línea celular de mieloma parental Sp2/0.

55 La Figura 5 muestra los niveles de transcripción del gen de la UPR en líneas celulares con una secreción alta en relación con la línea celular de mieloma parental FO.

La Figura 6 muestra los niveles de transcripción del gen de la UPR en líneas celulares con una secreción alta en relación con la línea celular de mieloma parental Ag-653.

60 La Figura 7 muestra los cambios en las tasas de secreción de anticuerpos como una función de la modificación de los niveles de transcripción del gen de la UPR.

La Figura 8 muestra unas tasas de secreción de anticuerpos más altas en células de mieloma transfectadas establemente con ácido nucleico que codifica siRNAs (o ARNips, en español) específicas de CHOP-10.

Resumen de la invención

65 [0009] Un aspecto de la invención es un método para aumentar la tasa de secreción celular de una proteína, que incluye los siguientes pasos:

a) regular la actividad de al menos un componente de la vía de respuesta a proteínas desplegadas (o UPR, por sus siglas en inglés) en una célula; y
b) cultivar las células,

de manera que el componente de la vía o ruta UPR es CHOP y de manera que la actividad de CHOP se modula o regula transfectando establemente la célula con un ácido nucleico que codifica un ARN pequeño de interferencia (ARNip o siRNA, por sus siglas en inglés) que apunta o está dirigido a los transcritos (o transcritos) de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CHOP, de manera que el ácido nucleico que codifica el siRNA es la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16.

[0010] Otro aspecto de la invención es una célula plasmática con una tasa de secreción celular modificada, tal y como se especifica en la reivindicación 8, que se obtiene regulando la actividad de CHOP en la célula mediante el método explicado previamente.

[0011] La divulgación también proporciona un animal transgénico que contiene una célula plasmática con una tasa de secreción celular modificada que se obtiene regulando la actividad del -al menos un- componente de la ruta UPR en una célula y cultivando las células.

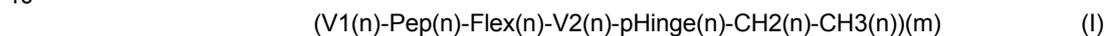
[0012] También se desvela un ácido nucleico aislado que tiene la secuencia que se muestra en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16.

Descripción detallada de la invención

[0013] Tal y como aparece en el presente texto, el término 'anticuerpos' se usa en un sentido amplio y comprende las moléculas de anticuerpos o inmunoglobulina, que comprenden los anticuerpos policlonales, los anticuerpos monoclonales -incluyendo los anticuerpos monoclonales murinos, humanos, humanizados y quiméricos- y los fragmentos o variantes de anticuerpos. Los anticuerpos son proteínas secretadas que las células plasmáticas expresan y secretan de forma constitutiva. Los anticuerpos también pueden producirse usando células plasmáticas inmortalizadas mediante métodos estándares como la generación de hibridomas o mediante la transfección de genes con cadenas pesadas y/o ligeras de anticuerpos en una célula B (o linfocito B) inmortalizada, como una célula de mieloma u otros tipos de células como células de ovario de hámster chino (o células CHO, por sus siglas en inglés), células vegetales o células de insectos.

[0014] Los fragmentos o variantes de anticuerpos incluyen mimeticuerpos, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fc, fragmentos de cadena pesada, fragmentos de cadena ligera y moléculas que contienen una porción de al menos una cadena peptídica de anticuerpos. Estas porciones pueden corresponder a las cadenas peptídicas de la región variable, la región bisagra o la región constante del anticuerpo.

[0015] Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'mimetocuerpo' ('mimetibody', en inglés) hace referencia a una proteína que tiene la fórmula genérica (I):



donde V1 es al menos una parte o porción de un extremo N-terminal de una región variable de una inmunoglobulina, Pep es al menos un péptido bioactivo que se une a un epítipo, Flex es un polipéptido que proporciona flexibilidad estructural permitiendo que el mimetocuerpo tenga orientaciones alternativas y propiedades de enlace, V2 es al menos una porción de un extremo C-terminal de una región variable de una inmunoglobulina, pHinge (o pBisagra) es al menos una porción de una región bisagra de una inmunoglobulina, CH2 es al menos una porción de una región constante CH2 de una inmunoglobulina y CH3 es al menos una porción de una región constante CH3 de una inmunoglobulina, de manera que n y m pueden ser un número entero entre 1 y 10. Un mimetocuerpo puede imitar las propiedades y funciones de diferentes tipos de moléculas de inmunoglobulina como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgD y IgE dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada presente en la construcción o molécula.

[0016] Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'anticuerpo monoclonal' (mAb, por sus siglas en inglés) hace referencia a un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) que se obtiene de una población de anticuerpos básicamente homogéneos. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y, normalmente, se dirigen contra un único determinante antigénico. El término 'monoclonal' señala el carácter básicamente homogéneo del anticuerpo y el hecho de que no sea necesario producir el anticuerpo mediante un método particular. Por ejemplo, los mAbs murinos pueden obtenerse mediante el método de hibridomas de Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975). Los mAbs quiméricos que contienen una región variable de la cadena pesada y la cadena ligera, que se obtiene a partir de un anticuerpo donante (normalmente murina), junto con regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera, que se obtienen a partir de un anticuerpo receptor o anticuerpo aceptor (normalmente, otra especie mamífera como la especie humana), pueden prepararse siguiendo el método que se desvela en la Patente de EE. UU. n° 4,816,567. Los mAbs humanizados que tienen CDRs provenientes de una inmunoglobulina donante no humana (normalmente murina), de manera que las restantes partes provenientes de la inmunoglobulina se obtienen de una o más inmunoglobulinas humanas y de manera que, opcionalmente, tienen residuos de apoyo del marco para preservar la

afinidad de enlace (o afinidad de unión), pueden obtenerse mediante las técnicas que se desvelan en Queen et al., Proc. Natl Acad Sci (USA), 86:10029-10032, (1989) y Hodgson et al., Bio/Technology, 9: 421, (1991).

[0017] Los mAbs completamente humanos que carecen de cualquier secuencia no humana pueden prepararse a partir de ratones transgénicos con inmunoglobulina humana mediante técnicas que se explican, por ejemplo, en Lonberg et al., Nature, 368: 856-859, (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14: 845-851, (1996) y Mendez et al., Nature Genetics, 15: 146-156, (1997). Los mAbs humanos también pueden prepararse y optimizarse utilizando las bibliotecas de expresión de fagos mediante las técnicas que se explican, por ejemplo, en Knappik et al., J. Mol. Biol., 296: 57-86, (2000) y Krebs et al., J. Immunol. Meth., 254: 67-84, (2001).

[0018] Tal y como se utiliza en el presente texto, la 'tasa o índice de secreción celular' hace referencia a la tasa -o ritmo- a la que una célula segrega o secreta una proteína determinada. Esta tasa puede describirse como el cambio en la cantidad de proteína(s) presente en el medio de cultivo respecto al cambio o transcurso del tiempo, o puede normalizarse usando el número de células y expresarse mediante las unidades 'pg/célula/día'.

[0019] Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'ARN pequeño de interferencia' hace referencia a una secuencia de ácido nucleico que regula la escisión o descomposición ('cleavage', en inglés) del transcrito -o transcripción- de un gen diana. Los ARNs pequeños de interferencia (ARNi o siRNAs, por sus siglas en inglés) pueden ser bicatenarios o de horquillado corto. Los siRNAs bicatenarios o de doble cadena pueden estar compuestos de dos cadenas de ARN individuales, antiparalelas e hibridadas, o cadenas de ácido nucleico hibridado, que contienen tanto ARN como ADN (por ejemplo, 5'-TTTTUUUU-3' hibridado o fijado con 5'-TTTTUUUU-3' o 5'-TTTT-3' hibridado con 5'-UUUU-3'). Los siRNAs del tipo de horquillado corto pueden estar compuestos de una sola cadena de ARN o una sola cadena híbrida de ARN:ADN que puede formar una estructura en tallo-bucle u otra estructura secundaria eficaz. Las personas versadas en la materia comprenderán que los siRNAs pueden comprender otras modificaciones como análogos de nucleósidos, modificaciones en el esqueleto o estructura central y otras modificaciones que permiten que el ácido nucleico siRNA modificado regule la escisión del transcrito de un gen diana.

[0020] Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'molécula pequeña' hace referencia a un compuesto con una masa molecular de menos de 24,000 g/mol que no está compuesto solamente de residuos de aminoácidos o residuos de ácido nucleico.

[0021] Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'secuencia de control transcripcional' hace referencia a una secuencia de ácido nucleico que es necesaria para la transcripción de un gen o una secuencia de ácido nucleico que aumenta o disminuye la transcripción de un gen.

[0022] Tal y como se utiliza en el presente texto y en las reivindicaciones, el término 'componente de la ruta UPR' hace referencia a cadenas peptídicas o secuencias de ácido nucleico, como las secuencias de control transcripcionales, que regulan la transmisión o comunicación a lo largo de la ruta UPR o activan la UPR.

[0023] La presente divulgación proporciona métodos que son útiles para modificar la tasa de secreción celular de una proteína por parte de una célula. Un uso ejemplar de los métodos de la divulgación es el aumento de las tasas de secreción en el caso de las proteínas que son útiles por motivos diagnósticos, terapéuticos o de investigación, como los anticuerpos.

[0024] Las tasas bajas de secreción de proteínas en líneas celulares pueden estar provocadas por la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE de la célula, lo cual ralentiza o detiene el proceso de secreción mediante la UPR. Las proteínas sensibles al estrés que están presentes en la membrana del RE detectan un exceso de proteínas mal plegadas y desencadenan la UPR. Posteriormente, mediante una compleja cascada de transducción de señales, la proteína chaperona Bip y los factores de transcripción XBP-1 y CHOP se regulan al alza.

[0025] Las proteínas chaperonas se unen a las proteínas desplegadas y ayudan a que se produzca un plegamiento correcto. Generalmente, el factor de transcripción CHOP se considera un regulador negativo del crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celulares. Se ha observado que la regulación al alza de CHOP provoca la parada del ciclo celular, lo cual da a la célula el tiempo necesario para hacer frente a las condiciones desfavorables que provocan la inducción de la UPR.

[0026] El factor de transcripción XBP-1 es necesario para producir células plasmáticas, los linfocitos B diferenciados que secretan grandes cantidades de inmunoglobulinas. Las células plasmáticas expresan una UPR modificada en la que se da una regulación al alza de algunos genes de la UPR antes de la síntesis de inmunoglobulina. Estos incluyen XBP-1, Bip, Grp94 y p50ATF6 alfa y su regulación al alza es necesaria para la diferenciación de las células plasmáticas y la secreción adecuada de anticuerpos (Gass, J.N., et al., J. Biol. Chem., 227, 49047-49054 (2002). Por el contrario, CHOP no se regula al alza durante esta transición, lo cual indica un tipo distinto de UPR. La regulación al alza de estas moléculas puede tener un efecto beneficioso o perjudicial, de manera que puede provocar un aumento en la tasa de secreción celular de proteínas o una apoptosis. Ver Kaufman, R.J., Genes Dev. 13, 1211-1233 (1999) y Cudna, R.E., et al., Biotechnol. Bioeng., 81, 56-65 (2003).

[0027] En un método de la presente divulgación, la tasa de secreción celular de una proteína se modifica modulando o regulando la actividad de al menos un componente de la ruta UPR en una célula y cultivando la célula. El método de la divulgación ayuda a aumentar o disminuir la tasa de secreción celular de una proteína, como un anticuerpo.

5 **[0028]** En una realización de la divulgación, la tasa de secreción celular de una proteína se aumenta transfectando establemente la célula con un ácido nucleico que codifica un componente de la ruta UPR. Los componentes de la ruta UPR pueden ser polipéptidos o secuencias de ácido nucleico, como una secuencia de control transcripcional, que regulan la transmisión o comunicación a lo largo de la ruta UPR o activan la UPR. Los ejemplos de componentes de la ruta UPR incluyen BiP, XBP y CHOP y variantes que tienen una actividad similar. Otros ejemplos de componentes de la ruta UPR incluyen IRE1, PERK, ATF4, ATF6, eIF2alfa, GRP78, GRP94, calreticulina, chaperonas y otras variantes que tienen una actividad similar (ver, por ejemplo, Cudna y Dickson, *Biotechnol. Bioeng.*, 81, 56-65 (2002)). Un ejemplo de una secuencia de control transcripcional es el elemento de la UPR que actúa en cis (UPRE) y ERSE, que se han identificado en los promotores de diferentes genes de la UPR. Aquellas personas con unos conocimientos y habilidades estándares en esta materia podrán reconocer otros componentes de la ruta UPR y otras secuencias de control transcripcionales. El componente de la ruta UPR puede tener una secuencia de aminoácidos como las que se muestran en SEQ ID NO: 2 (BiP murino), SEQ ID NO: 4 (XBP-1 murino, forma empalmada), SEQ ID NO: 6 (XBP-1 murino, forma sin empalmar), SEQ ID NO: 8 (CHOP-10 murino), SEQ ID NO: 10 (BiP humano), SEQ ID NO: 12 (XBP-1 humano) o SEQ ID NO: 14 (CHOP-10 humano). El ácido nucleico del componente de la ruta UPR puede tener una secuencia como las que se muestran en SEQ ID NO: 1 (ARNm de BiP murino), SEQ ID NO: 3 (XBP-1 murino, ARNm en su forma empalmada), SEQ ID NO: 5 (XBP-1 murino, forma sin empalmar, ARNm), SEQ ID NO: 7 (ARNm de CHOP-10 murino), SEQ ID NO: 9 (ARNm de BiP humano), SEQ ID NO: 11 (ARNm de XBP-1 humano), SEQ ID NO: 13 (ARNm de CHOP-10 humano).

15 **[0029]** Las variantes de estas secuencias que tengan una actividad similar a la molécula parental también son útiles en los métodos de la divulgación. Por ejemplo, las moléculas variantes que tienen al menos un 80% de igualdad o identidad con la molécula parental deberían tener una actividad similar. El porcentaje de igualdad o identidad entre dos secuencias de proteínas puede determinarse usando el algoritmo BLASTP con el filtrado apagado y todos los demás ajustes por defecto inalterados. Las diferentes isoformas de un polipéptido, las versiones dominantes negativas de un polipéptido o las formas modificadas covalentemente de un polipéptido son algunos ejemplos de variantes de una molécula parental.

25 **[0030]** La expresión génica de un componente de la ruta UPR, como BiP o CHOP, puede disminuirse mediante una célula con moléculas de ARN pequeño de interferencia (siRNA) o moléculas antisentido.

35 **[0031]** De acuerdo con la presente divulgación, la tasa de secreción celular de una proteína puede aumentarse modulando el componente de la ruta UPR mediante la administración de una molécula pequeña. Una molécula ejemplar es la taspigargina, un agente de inducción de la UPR (Litton, J., *J. Biol. Chem.*, 26, 17067-17071 (1991)). Otros ejemplos de estas moléculas pequeñas incluyen la tunicamicina y los lipopolisacáridos.

40 **[0032]** Además, la tasa de secreción celular de una proteína puede aumentarse poniendo las células en una fase de crecimiento estático. Las células pueden ponerse en una fase de crecimiento estático limitando la disponibilidad de nutrientes, permitiendo que se acumulen los desechos celulares y modificando el pH del medio de cultivo celular. Aquellas personas versadas en la materia también conocerán otros métodos para poner las células en una fase de crecimiento estático.

45 **[0033]** En los métodos de la invención, las células ejemplares son células plasmáticas, es decir, células B diferenciadas que secretan anticuerpos. Las células plasmáticas pueden aislarse de fuentes murinas o humanas u otras fuentes animales. Normalmente, las células plasmáticas se han inmortalizado mediante técnicas estándares como la infección vírica, por ejemplo con virus de Epstein-Barr, u otros métodos como la mutagénesis radiológica o química. Las células plasmáticas inmortalizadas también pueden ser cancerosas y pueden obtenerse inyectando aceite mineral u otro compuesto en la cavidad peritoneal de un animal.

50 **[0034]** En una realización de la invención, los acompañantes de fusión inmortalizados son lo que en este campo se conoce como 'células de mieloma'. Normalmente, los mielomas se forman de la fusión de células esplénicas con un acompañante de fusión inmortalizado que se ha obtenido de un organismo que padece mieloma múltiple, un cáncer de la médula ósea. El organismo puede ser un pájaro, pez, reptil, mamífero u otro animal (Animalia). Los ejemplos de líneas celulares de mieloma incluyen las líneas celulares SP2/0 ('American Type Culture Collection' (ATCC), Manassas, Virginia, Estados Unidos, CRL-1581), NSO ('European Collection of Cell Cultures' -Colección europea de cultivos celulares-, (ECACC), Salisbury, Wiltshire, Reino Unido, ECACC N° 85110503), FO (ATCC CRL-1646), y Ag653 (ATCC CRL-1580), obtenidas a partir de ratones. Un ejemplo de línea celular de mieloma obtenida de humanos es la línea celular U266 (ATCC CRL-TIB-196). Aquellas personas versadas en la materia conocerán otras líneas celulares de mieloma.

55 **[0035]** En una realización de la invención, las células de mieloma se transfectan establemente con una molécula de ADN. Las células de mieloma transfectadas establemente pueden obtenerse mediante métodos de transfección, cribado y selección que resultan muy conocidos para aquellas personas con unas habilidades y conocimientos

estándares en este campo. Las secuencias de ADN que se usan para transfectar establemente las células pueden integrarse aleatoriamente en el ADN de una célula de mieloma o pueden integrarse en un sitio específico. Estas secuencias de ADN pueden codificar componentes de la ruta UPR. Además, las secuencias de ácido nucleico transfectadas establemente pueden desactivar o eliminar insercionalmente un componente de la UPR, como un gen de la UPR o una secuencia de control transcripcional.

[0036] De acuerdo con la invención, la tasa de secreción celular de una proteína se aumenta transfectando establemente la célula con una secuencia de ácido nucleico que codifica un siRNA que apunta o está dirigido a los transcritos (o transcritos) de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CHOP. Las proteínas CHOP ejemplares son aquellas que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 8 or SEQ ID NO:14. La transfección estable con una secuencia de ácido nucleico que codifica un siRNA que apunta o está dirigido a los transcritos de secuencias de ácido nucleico que codifican una CHOP-10 murina es útil para los métodos de la invención. El siRNA ejemplar específico para transcritos génicos de CHOP-10 murina, tal y como se usa en los métodos de la invención, comprende las secuencias de nucleótidos que se muestran en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16. Aquellas personas versadas en la materia conocerán otros ácidos nucleicos que codifican siRNAs que apuntan a transcritos de genes de la UPR.

[0037] Otras células que son útiles para los métodos de la invención incluyen la células de ovario de hámster chino (o células CHO), las células de insectos y las células vegetales.

[0038] De acuerdo con la presente divulgación, pueden obtenerse animales transgénicos que expresan proteínas de la UPR de forma inductiva o constitutiva a niveles elevados con respecto a animales no transgénicos. Las técnicas para obtener animales transgénicos son bien conocidas en este campo.

[0039] En los métodos de la invención, se cultivan las células. Las células pueden cultivarse en suspensión o en cultivos adherentes. Las células pueden cultivarse en diversos recipientes, incluyendo -por ejemplo- biorreactores, bolsas de células, placas de cultivo, frascos u otros recipientes que resultan muy conocidos para aquellas personas con conocimientos y habilidades estándares en este campo. Las células pueden cultivarse en cualquier medio adecuado, incluyendo las formulaciones de medios químicamente definidos. Las condiciones ambientales que son adecuadas para el cultivo celular, como la temperatura y la composición atmosférica, también resultan muy conocidas para las personas versadas en la materia. Los métodos para el cultivo de células también resultan muy conocidos para las personas versadas en la materia.

[0040] La presente invención también proporciona células plasmáticas con tasas modificadas de secreción celular que se obtienen gracias a los métodos de la invención. Las células plasmáticas se obtienen modulando la actividad de CHOP en la célula con un ácido nucleico transfectado establemente que codifica un ARN pequeño de interferencia que apunta o está dirigido a transcritos de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CHOP, de manera que el ácido nucleico que codifica el siRNA es la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO:16. La célula plasmática que se proporciona puede ser, por ejemplo, una célula derivada de SP2/0, como una célula C2-8 o C2-18. Estas células plasmáticas pueden secretar un anticuerpo u otro polipéptido que se vayan a purificar.

[0041] La presente invención se describe a continuación mediante los siguientes Ejemplos específicos y no limitativos.

Ejemplo 1

Niveles de transcritos génicos de la UPR en líneas celulares con una secreción alta

[0042] Se analizaron líneas celulares que secretaban mAbs en grandes cantidades para estudiar los niveles de transcritos génicos de la UPR en comparación con las líneas celulares que secretaban mAbs idénticos en cantidades pequeñas. Las líneas celulares examinadas incluían las líneas con una secreción elevada C505B, C505C y C505D. Las líneas celulares con una secreción baja que se analizaron fueron la línea C505A y SP2/0, la línea celular de mieloma parental de C505A, B, C y D. Todas estas líneas se transfectaron con ADN que codifica las cadenas pesadas y ligeras de un mAb de IgG1 humana que específico para α v-integrina. Las líneas celulares C505B, C505C y C505D se identificaron mediante subclonaje secuencial, cribado y selección de las tasas elevadas de secreción de mAb.

[0043] Las tasas de secreción de anticuerpos se determinaron midiendo la cantidad de mAb secretada en un periodo de 24 h en el medio de cultivo celular y contando el número de células viables para obtener una tasa de secreción celular en unidades de 'pg/células viables/día'. La línea C505a segrega o secreta anticuerpos en tasas bajas de 5-7 pg/célula viable/día, equivalentes a una concentración de alrededor de 5-10 μ g/mL/7 días. La línea C505B produce anticuerpos a un ritmo de alrededor de 15 pg/célula viable/día, C505C produce a un ritmo de alrededor de 13 pg/célula viable/día y C505D produce a un ritmo de alrededor de 15 pg/célula viable/día.

[0044] Todas las líneas celulares que secretan mAb y la línea celular de mieloma parental se cultivaron en

suspensión a 37° C en un medio IMDM que contenía un 5% de FBS, 2 mM de glutamina y 2mM de piruvato en una atmósfera de un 5% de CO₂. Un medio seleccionado de 1X MHX que contenía 0,5 mg/L de ácido micofenólico, 2,5 mg/L de hipoxantina y 50 mg/L de xantina también estaba presente en el medio.

5 **[0045]** Las diferencias en los niveles de transcritos génicos de la UPR entre las líneas celulares con una expresión alta y las líneas celulares con una expresión baja se analizaron mediante una PCR cuantitativa (Q-PCR, por sus siglas en inglés). Las células se cultivaron en la fase de crecimiento exponencial y el ARN total se aisló de 5x10⁶ células usando el sistema RNEasy™ (Qiagen Inc., Valencia, California, Estados Unidos). Se realizó una Q-PCR usando una reacción estándar de dos pasos. El paso de síntesis de ADNc se realizó usando 'Superscript™ II reverse transcriptase' (Transcriptasa inversa SuperScript™) (Invitrogen Inc., Carlsbad, California, Estados Unidos) y usando cebadores -o 'primers'- hexámeros aleatorios siguiendo las condiciones reactivas especificadas por el fabricante. Después, se realizó una Q-PCR Taqman™ (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos) usando las herramientas ABI PRISM™ 7000HT o 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos) según las especificaciones del fabricante. Se usaron 5000 pg de ARN en cada reacción de Q-PCR. Los cebadores específicos para BiP, CHOP y XBP y las combinaciones de sonda utilizadas para la Q-PCR se diseñaron usando el software Primer Express™ (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos). Los niveles de ADNc se regularon o normalizaron respecto a los niveles de transcripción del gen constitutivo (o gen 'housekeeping') de Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y, posteriormente, se normalizaron al valor de transcripción de ADNc/GAPDH para la línea celular parental apropiada. La recogida de datos y la cuantificación de transcripción en la fase exponencial temprana de la PCR se realizaron utilizando las herramientas ABI PRISM™ 7000HT o 7900HT y el software correspondiente.

25 **[0046]** Los resultados se muestran en la Figura 1 y demuestran que los niveles de transcritos génicos de la UPR de BiP y XBP-1 fueron alrededor de 3-4 veces más elevados en las líneas celulares con una secreción alta que en las células con una secreción baja. Las diferencias en los niveles de CHOP fueron menos acusadas.

Ejemplo 2

30 **Niveles de transcritos génicos de la UPR y tasas de secreción de anticuerpos en células en fase de crecimiento estático**

[0047] Se analizaron las células en fase de crecimiento estático para estudiar los niveles de transcritos génicos de la UPR y las tasas de secreción de mAb en relación con la fase de crecimiento exponencial. La línea celular C168J es un transfectoma proveniente de la línea celular de mieloma parental SP2/0 y secreta mAb de IgG1 a un ritmo de 25-30 pg/célula/día. El caso de C505A es el que se ha descrito previamente en el Ejemplo 1.

40 **[0048]** Las tasas de secreción de mAb de IgG1 de las líneas celulares C505A, C168J y SP2/0 se analizaron sembrando 5x10⁶ células en matraces de T-75 o T-150 y cultivándolas como se describe en el Ejemplo 1. Después de 3 días, las células se encontraban en la fase de crecimiento exponencial y, después de 6 días, las células estaban en la fase de crecimiento estático. El número total de células y el número de células viables se determinó para las células en ambas fases de crecimiento. Los medios de cultivo de las células en ambas fases de crecimiento se examinaron para analizar la IgG humana mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) estándar. Se realizó una Q-PCR específica para BiP, CHOP y XBP-1 con las células en fase de crecimiento estático y exponencial como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1.

45 **[0049]** Los resultados que se muestran en la Tabla 1 demuestran que las líneas C505A y C168j aumentaron las tasas de secreción de mAb de IgG1 (Tabla 1).

Tabla 1: Tasa de IgG1 secretada (pg/célula/día)

Línea celular	Fase exponencial	Fase estática
C505A	3,90	5,40
C168j	10,40	13,90
SP2/0	0	0

55 Asimismo, los resultados que se muestran en la Figura 2 demuestran unos mayores niveles de transcritos génicos de la UPR en C505A, C168j y Sp2/0 en la fase de crecimiento estático en relación con la fase de crecimiento exponencial.

Ejemplo 3

Niveles de transcritos génicos de la UPR en líneas celulares de mieloma parentales

[0050] Se examinaron los niveles de transcritos génicos de la UPR en las líneas celulares de mieloma parentales SP2/0, NSO, FO y Ag653 para determinar si las líneas celulares con una secreción más alta contenían unos niveles más altos de genes de la UPR. Se cultivaron células de SP2/0, NSO, FO y Ag653 en la fase de crecimiento exponencial y el ARN total se aisló de 5×10^6 células como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1. También se realizaron análisis y Q-PCR como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los resultados que se muestran en la Figura 3 muestran unos niveles comparables de transcripción de BiP y CHOP en todas las células examinadas. Sin embargo, los niveles de transcripción de XBP-1 eran elevados en las células de FO y NSO en relación con los demás tipos de células examinados.

Ejemplo 4**Niveles de transcritos génicos de la UPR en líneas celulares con una secreción alta y líneas celulares de mieloma parentales**

[0051] Se analizaron las líneas celulares que secretan mAbs en tasas elevadas para estudiar los niveles de transcritos génicos de la UPR en comparación con sus líneas celulares parentales. Las líneas celulares que se indican en las Figuras 4-6 se cultivaron para la fase de crecimiento exponencial y el ARN total se aisló de 5×10^6 células como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1. También se realizaron análisis y Q-PCR como se ha descrito en el Ejemplo 1.

[0052] Los resultados que se muestran en las Figuras 4-6 demuestran que las líneas celulares que secretan mAbs en tasas más elevadas tienen unos niveles más elevados de transcritos génicos de la UPR en relación con sus líneas parentales de células de mieloma SP2/0, FO y Ag653. Estos resultados sugieren que el aumento en la expresión génica de la UPR está relacionado con el aumento en las tasas de secreción de anticuerpos independientemente de la identidad de la línea celular de mieloma parental que se haya utilizado para producir las células con una secreción alta.

Ejemplo 5**Expresión de proteínas de la UPR tras la inducción de la UPR**

[0053] La expresión de proteínas de la UPR en células con una secreción alta en comparación con células con una secreción baja y líneas celulares de mieloma parentales se analizó tras la inducción de la UPR por medio del agente farmacológico tpsigargina. La tpsigargina es un inhibidor de la ATPasa que bloquea el bombeo de ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA) y provoca la disminución de calcio en el canal del RE.

[0054] Las células se trataron con 100 nM de tpsigargina y se prepararon 'Western blots' específicos para XBP-1 y CHOP. Se provocó la lisis de las células en momentos específicos en un buffer o tampón de lisis de radioinmunoprecipitación (RIPA) (1X PBS, 1% de N-P40, 0,5% de desoxicolato de sodio, 0,1% de dodecilsulfato de sodio, 1 mM de PMSF e inhibidores de proteasa de Roche (Catalog N° 1836153)) y las concentraciones de proteínas en los lisados clarificados se cuantificaron usando un ensayo proteico estándar con ácido bicinonínico (BCA, pos sus siglas en inglés)(Sigma Catalog. N° B9643). Para los Western blots, se usaron 20 μg de cada lisado con un gel SDS-PAGE estándar, se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, pos sus siglas en inglés) y se examinaron con anticuerpos específicos para XBP-1 o CHOP (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, Estados Unidos).

[0055] Los resultados (no se muestran) indicaron que las proteínas de UPR en células con una secreción alta se expresan en niveles elevados en comparación con las células con una secreción baja y las líneas celulares de mieloma parentales. El Western blot específico para XBP-1 indicó que la expresión de la proteína XBP-1 se induce ampliamente en las células C168j con una secreción alta y tratadas con tpsigargina. Esta inducción de la expresión de XBP-1 es más marcada 7 horas después de la inducción farmacológica de la UPR, y es visible tan solo 2 horas después del tratamiento. El Western blot específico para CHOP indicó que la expresión de la proteína CHOP se induce ampliamente en las células C168j con una secreción alta y tratadas con tpsigargina. La CHOP aparece primero tras 2 horas, alcanza su grado máximo de expresión a las 4-7 horas y disminuye en gran medida tras 22 horas.

Ejemplo 6**Niveles crecientes en la expresión de proteínas de la UPR**

[0056] Las células se transfectaron temporalmente con vectores de expresión de BiP y XBP-1 con el objetivo de aumentar los niveles de expresión celular de estas proteínas de la UPR. Se cultivaron células HEK293T/17 (ATCC CRL-11268) en cultivos adherentes a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO_2 y se cultivaron en un medio IMDM ('Iscove's Modified Dulbecco's Minimal Essential Medium') que contenía un 5% de FBS, 2mM de glutamina y 2 mM

de piruvato. Utilizando métodos estándares, los ADNcs que codifican la isoforma 1 de XBP-1 (Registro NCBI AF027963), la isoforma 2 de XBP-1 (Registro NCBI AF443192) o BiP se subclonaron en un vector útil para experimentos de transfección temporal. El vector expresa la proteína zsGreen1 bajo el control de un promotor CMV y tiene un sitio de clonado múltiple para introducir una región de codificación adicional bajo el control de un promotor CMV. Se usó un gen resistente a la kanamicina para la selección bacteriana. Después, las células HEK293T/17 se dejaron sin transfectar o se transfectaron temporalmente sólo con el vector vacío, con el vector de expresión de la isoforma 1 de XBP-1, con el vector de expresión de la isoforma 2 de XBP-1 o con el vector de expresión de BiP. Las transfecciones se realizaron usando el reactivo Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen Inc., Carlsbad, California, Estados Unidos) y siguiendo las indicaciones del fabricante. 48 horas después de la transfección, se provocó la lisis de las células en un tampón de lisis RIPA y se colocaron los mismos equivalentes celulares de lisados clarificados en los geles SDS-PAGE. Después se prepararon los Western blots y se examinaron como se ha descrito previamente en el Ejemplo 5. Los 'blots' o transferencias se dividieron en tiras y se volvieron a analizar con un anticuerpo específico para la actina para confirmar que había la misma carga de proteínas en cada una.

[0057] Los resultados (no se muestran) demostraron que los niveles de expresión de la isoforma 1 de XBP-1 (calle o carril denominado 'XBP-1') y la isoforma 2 de XBP-1 (carril denominado 'X54') aumentaron en las células que se transfectaron temporalmente con vectores de expresión que codificaban estas isoformas de XBP-1. Asimismo, los datos (no se muestran) indicaron que los niveles de expresión de BiP aumentaron en las células que se transfectaron temporalmente con vectores de expresión que codificaban la BiP, y no se detectó ninguna expresión de BiP en las células que se dejaron sin transfectar o que se transfectaron sólo con el vector vacío.

Ejemplo 7

Efectos de los niveles de transcritos génicos de la UPR sobre las tasas de secreción de anticuerpos

[0058] Se analizó el efecto de los niveles de transcritos génicos de la UPR sobre las tasas de secreción de anticuerpos. Se diseñaron moléculas de siRNA de cadena doble que apuntaban o estaban dirigidas a transcritos génicos de BiP, CHOP y XBP-1 usando el 'siRNA Target Finder Tool' (www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) de Ambion alojado en Internet y se sintetizaron usando el 'Silencer™ siRNA Construction Kit' (Ambion Inc., Woodward, Texas, Estados Unidos, nº de Catálogo 11620). Se diseñaron dos siRNAs para cada transcrito diana. 3x10⁶ células C168J cultivadas en condiciones estándares se transfectaron mediante electroporación con 3 µg de cada siRNA de cadena doble, tal y como se indica en la Figura 10. Las células electroporadas se suspendieron en 2 ml de medio IMDM tal y como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1 y después se cultivaron en placas T-12. Las concentraciones de células viables se determinaron 8 días después. Las concentraciones de mAb de IgG1 también se determinaron 8 días después utilizando técnicas estándares de nefelometría.

[0059] Los resultados de la Figura 7 muestran que las tasas de secreción de anticuerpos pueden regularse o modularse modificando los niveles de transcritos génicos de la UPR en las tasas de secreción de anticuerpos. La transfección de células C168J -con una secreción alta- con ARNs pequeños de interferencia (siRNAs) que pueden prevenir la expresión de las isoformas BiP, CHOP y XBP-1 de los genes de la UPR a partir de transcritos de ARN redujo las tasas de secreción de IgG1 por parte de las células C168J.

Ejemplo 8

Aumentar las tasas de secreción de anticuerpos aumentando los niveles de expresión y transcripción génica de la UPR

[0060] La sobreexpresión de proteínas de la UPR puede aumentar las tasas de secreción de proteínas como mAbs por parte de las células. Las líneas celulares que secretan proteínas, como las líneas celulares que secretan mAbs, se transfectan con construcciones de vectores de expresión que codifican BiP, CHOP, XBP-1 y otras proteínas asociadas con la UPR para conseguir la sobreexpresión de estas proteínas. Las células se transfectan con estas construcciones de vectores de expresión tanto de forma individual como de forma combinada. Las tasas de secreción de proteínas apropiadas, como las tasas de secreción de anticuerpos, se determinan 2, 4 y 6 días después de la transfección utilizando técnicas estándares. Las tasas de secreción de proteínas en células transfectadas se comparan con las tasas de secreción de células de control no transfectadas. Se espera que las tasas de secreción de proteínas sean más elevadas en las células que sobreexpresan una o más proteínas de la UPR. En caso de que la sobreexpresión constitutiva de BiP o XBP-1 acabe provocando la apoptosis de estas células, estos genes pueden colocarse 'aguas abajo' de un promotor inducible y activarse sólo cuando sea necesario.

Ejemplo 9

Aumentar las tasas de secreción de anticuerpos en células de mieloma transfectadas establemente con una CHOP-10 que codifica siRNA

5 **[0061]** La transfección estable de células de mieloma C465A con construcciones de ADN que producían siRNAs específicos para CHOP-10 aumentó las tasas de secreción (Figura 8). Se diseñaron dos moléculas diferentes de siRNA dirigidas a transcritos génicos de CHOP-10 usando el 'siRNA Target Finder Tool' (www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) de Ambion alojado en Internet. Las moléculas de siRNA que se diseñaron eran de horquillado corto. Los ácidos nucleicos que codificaban estos siRNAs (SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16) se sintetizaron y clonaron en los sitios BamHI y HindIII del vector pSILENCER4.1-neo (Ambion Inc., Woodward, Texas, Estados Unidos) utilizando métodos estándares. La clonación de la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 15 en el pSILENCER4.1-neo produjo pCHOP1, mientras que la clonación de las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 16 en este vector produjo pCHOP2. Después, los ADNs plasmídicos de pCHOP1, pCHOP2 y pSILENCER4.1-neo se transfectaron de forma separada en células de mieloma C465A mediante electroporación. Después, las células de mieloma transfectadas establemente que contenían estos vectores se seleccionaron en un medio de SFM8 que contenía un 10% de FBS y 300 µg/ml de G418 por cultivo a 37° C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Este medio de selección también contenía un medio de selección de 1X MHX que contenía 0,5 mg/L de ácido micofenólico, 2,5 mg/L de hipoxantina y 50 mg/L de xantina para mantener una expresión estable de anticuerpos por parte de las células C465A.

20 **[0062]** Cada línea celular que se muestra en la Figura 8 se cultivó en suspensión durante seis días en un medio de SFM8 que contenía un 10% de FBS, 1X MHX y 300 µg/ml de G418. La densidad de las células viables y los títulos - o concentraciones- de los anticuerpos se determinaron a diario durante este periodo de seis días. La densidad de las células viables se analizó mediante ensayos estándares de exclusión de tinte y el título de los anticuerpos en el medio de cultivo se analizó mediante técnicas estándares de nefelometría. La línea de células de mieloma C465A se deriva de la línea de células mieloma SP2/0 y expresa de forma estable un mAb murino específico para TNF-alfa humano del isotipo IgG1 kappa. La línea de células de mieloma C2-8 es una línea celular derivada de C465A transfectada establemente con pCHOP1. La línea de células de mieloma C2-18 es una línea celular derivada de C465A transfectada establemente con pCHOP2. Las líneas celulares V11 y V12 son líneas celulares derivadas de C465A transfectadas establemente con pSILENCER4.1-neo solo; las dos líneas se obtuvieron de forma independiente.

30 **[0063]** Los datos obtenidos indicaron que los siRNAs específicos de CHOP-10 codificados por pCHOP1 y pCHOP2 aumentaron la productividad específica de anticuerpos en comparación con las líneas celulares de control C465A, V11 y V12 (Figura 8).

35 **[0064]** Una vez que la presente invención se ha descrito por completo, para aquellas personas con unas habilidades y conocimientos estándares en este campo resultará evidente que pueden realizarse muchos cambios y modificaciones sin apartarse por ello del alcance de las reivindicaciones anexas.

<110> Centocor Ortho Biotech Inc.

<120> Métodos para modificar las tasas de producción de proteínas

<130> P056080EP

<140>

<141>

<150> EP 05742266.9

<151> 2005-03-31

<150> PCT/US2005/010605

<151> 2005-03-31

<150> 60/558,239

<151> 2004-03-31

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1965

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 1

ES 2 673 518 T3

atgatgaagt	tcaactgtggt	ggcggcggcg	ttgctgctgc	tgggcgcggt	gcggggccgag	60
gaggaggaca	agaaggagga	tgtgggcacg	gtggtcggca	tcgacttggg	gaccacctat	120
tcctgcgtcg	gtgtgttcaa	gaacggccgc	gtggagatca	tagccaacga	tcagggcaac	180
cgcatcacgc	cgtcgtatgt	ggccttcaact	cctgaagggg	agcgtctgat	tggcgtatgcg	240
gccaagaacc	aactcacgtc	caaccccagag	aacacggtct	tcgatgccaa	gcgcctcatc	300
ggacgcactt	ggaatgacct	ttcgggtgcag	caggacatca	agttcttgcc	attcaagggtg	360
gttgaaaaga	aaactaaacc	gtacattcaa	gttgatattg	gaggtgggca	aaccaagaca	420
tttgccccag	aagaaatttc	tgccatgggt	ctcactaaaa	tgaaggagac	tgctgaggcg	480
tatttgggaa	agaaggttac	ccatgcagtt	gttactgtac	cagcttactt	caatgatgcc	540
cagcgacaag	caaccaaaga	tgctggcact	attgctggac	tgaatgtcat	gaggatcatc	600
aatgagccta	cagcagctgc	tattgcatat	ggcctggata	agagagaggg	agagaagaac	660
atccttgtgt	ttgacctggg	tggcggcacc	ttcgatgtgt	ctcttctcac	cattgacaat	720
ggtgtctttg	aagtgggtggc	cactaatgga	gatactcacc	tgggtgggga	agactttgat	780
cagcgggtca	tggaacactt	catcaagttg	tacaaaaaga	aaactggtaa	agatgttagg	840
aaagacaaca	gagctgtgca	gaaactccgg	cgtgaggtag	aaaaggctaa	gagagccttg	900
tcttctcagc	atcaagcaag	gattgaaatt	gagtccttct	tcgaaggaga	agacttctca	960
gagaccctta	ctcgggccaa	atltgaagag	ctgaacatgg	acctgttccg	ctctaccatg	1020
aagcctgtcc	aggaagtgtt	ggaagactct	gatctgaaga	aatctgatat	tgatgaaatt	1080
gttctgggtg	gtggatctac	tcgaattcca	aagattcagc	aactggtgaa	agagttcttc	1140
aatggcaagg	agccatcccg	tggcataaac	cccgatgagg	ctgtagccta	tgggtgccgct	1200
gtccaggctg	gtgtcctctc	tgggtgatcag	gatacaggtg	atctggtaact	gcttgatggt	1260
tgtcccctta	cacttgggat	tgaaactgtg	ggaggagtca	tgacaaaact	gattccaagg	1320
aactgtgtgg	taccaccaaa	gaagtctcag	atcttctcca	cggcttccga	taatcagcca	1380
actgtaacaa	tcaaggtcta	tgaaggtgaa	cgacccttaa	caaaagacaa	tcacttcttg	1440
ggtacatttg	atctgactgg	aattcctcct	gctccccgtg	gagttcccca	gattgaagtc	1500
acttttgaga	tagatgttaa	tggattatc	cgagtgacag	ctgaagacaa	aggtacagga	1560
aacaaaaaca	aatcacaat	taccaatgac	caaaaccgcc	tgacacctga	agaaattgaa	1620
aggatggtta	atgatgctga	gaagtttgct	gaggaagaca	aaaagctcaa	agagcgcatt	1680
gacaccagga	atgaattgga	aagctatgct	tattctctca	agaaccagat	tggagataaa	1740
gaaaagctgg	gaggtaaact	ttcttctgag	gataaagaaa	ccatggaaaa	agctgtagag	1800
gaaaagattg	aatggctgga	aagccaccag	gatgcggaca	ttgaagactt	taaagccaaa	1860
aagaaggaac	tagaagaaat	tgttcagcca	attatcagca	aactctatgg	aagtggaggc	1920
cctcccccaa	ctggtgaaga	ggatacatca	gaaaaagatg	agttg		1965

<210> 2
 <211> 655
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 2

15

20

25

ES 2 673 518 T3

Met Met Lys Phe Thr Val Val Ala Ala Ala Leu Leu Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15
Val Arg Ala Glu Glu Glu Asp Lys Lys Glu Asp Val Gly Thr Val Val
20 25 30
Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser Cys Val Gly Val Phe Lys Asn
35 40 45
Gly Arg Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp Gln Gly Asn Arg Ile Thr Pro
50 55 60
Ser Tyr Val Ala Phe Thr Pro Glu Gly Glu Arg Leu Ile Gly Asp Ala
65 70 75 80
Ala Lys Asn Gln Leu Thr Ser Asn Pro Glu Asn Thr Val Phe Asp Ala
85 90 95
Lys Arg Leu Ile Gly Arg Thr Trp Asn Asp Pro Ser Val Gln Gln Asp
100 105 110
Ile Lys Phe Leu Pro Phe Lys Val Val Glu Lys Lys Thr Lys Pro Tyr
115 120 125
Ile Gln Val Asp Ile Gly Gly Gly Gln Thr Lys Thr Phe Ala Pro Glu
130 135 140
Glu Ile Ser Ala Met Val Leu Thr Lys Met Lys Glu Thr Ala Glu Ala
145 150 155 160
Tyr Leu Gly Lys Lys Val Thr His Ala Val Val Thr Val Pro Ala Tyr
165 170 175
Phe Asn Asp Ala Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp Ala Gly Thr Ile Ala
180 185 190
Gly Leu Asn Val Met Arg Ile Ile Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Ile
195 200 205
Ala Tyr Gly Leu Asp Lys Arg Glu Gly Glu Lys Asn Ile Leu Val Phe
210 215 220
Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val Ser Leu Leu Thr Ile Asp Asn
225 230 235 240
Gly Val Phe Glu Val Val Ala Thr Asn Gly Asp Thr His Leu Gly Gly
245 250 255
Glu Asp Phe Asp Gln Arg Val Met Glu His Phe Ile Lys Leu Tyr Lys
260 265 270
Lys Lys Thr Gly Lys Asp Val Arg Lys Asp Asn Arg Ala Val Gln Lys
275 280 285
Leu Arg Arg Glu Val Glu Lys Ala Lys Arg Ala Leu Ser Ser Gln His
290 295 300
Gln Ala Arg Ile Glu Ile Glu Ser Phe Phe Glu Gly Glu Asp Phe Ser
305 310 315 320
Glu Thr Leu Thr Arg Ala Lys Phe Glu Glu Leu Asn Met Asp Leu Phe
325 330 335
Arg Ser Thr Met Lys Pro Val Gln Glu Val Leu Glu Asp Ser Asp Leu
340 345 350
Lys Lys Ser Asp Ile Asp Glu Ile Val Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg
355 360 365
Ile Pro Lys Ile Gln Gln Leu Val Lys Glu Phe Phe Asn Gly Lys Glu
370 375 380
Pro Ser Arg Gly Ile Asn Pro Asp Glu Ala Val Ala Tyr Gly Ala Ala

ES 2 673 518 T3

385					390					395					400
Val	Gln	Ala	Gly	Val	Leu	Ser	Gly	Asp	Gln	Asp	Thr	Gly	Asp	Leu	Val
				405					410					415	
Leu	Leu	Asp	Val	Cys	Pro	Leu	Thr	Leu	Gly	Ile	Glu	Thr	Val	Gly	Gly
			420					425					430		
Val	Met	Thr	Lys	Leu	Ile	Pro	Arg	Asn	Thr	Val	Val	Pro	Thr	Lys	Lys
		435					440					445			
Ser	Gln	Ile	Phe	Ser	Thr	Ala	Ser	Asp	Asn	Gln	Pro	Thr	Val	Thr	Ile
	450					455					460				
Lys	Val	Tyr	Glu	Gly	Glu	Arg	Pro	Leu	Thr	Lys	Asp	Asn	His	Leu	Leu
465					470					475				480	
Gly	Thr	Phe	Asp	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Val	Pro
				485				490						495	
Gln	Ile	Glu	Val	Thr	Phe	Glu	Ile	Asp	Val	Asn	Gly	Ile	Ile	Arg	Val
			500					505					510		
Thr	Ala	Glu	Asp	Lys	Gly	Thr	Gly	Asn	Lys	Asn	Lys	Ile	Thr	Ile	Thr
		515					520					525			
Asn	Asp	Gln	Asn	Arg	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Ile	Glu	Arg	Met	Val	Asn
	530					535					540				
Asp	Ala	Glu	Lys	Phe	Ala	Glu	Glu	Asp	Lys	Lys	Leu	Lys	Glu	Arg	Ile
545					550					555					560
Asp	Thr	Arg	Asn	Glu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ala	Tyr	Ser	Leu	Lys	Asn	Gln
			565					570						575	
Ile	Gly	Asp	Lys	Glu	Lys	Leu	Gly	Gly	Lys	Leu	Ser	Ser	Glu	Asp	Lys
			580					585					590		
Glu	Thr	Met	Glu	Lys	Ala	Val	Glu	Glu	Lys	Ile	Glu	Trp	Leu	Glu	Ser
		595					600					605			
His	Gln	Asp	Ala	Asp	Ile	Glu	Asp	Phe	Lys	Ala	Lys	Lys	Lys	Glu	Leu
	610					615					620				
Glu	Glu	Ile	Val	Gln	Pro	Ile	Ile	Ser	Lys	Leu	Tyr	Gly	Ser	Gly	Gly
625					630					635				640	
Pro	Pro	Pro	Thr	Gly	Glu	Glu	Asp	Thr	Ser	Glu	Lys	Asp	Glu	Leu	
				645					650					655	

<210> 3

<211> 1113

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 3

10

15

20

ES 2 673 518 T3

```

atggtggtgg tggcagcggc gccgagcgcg gccacggcgg cccccaagt gctactctta      60
tctggccagc ccgcctccgg cggccggggc ctgccgctca tggtagccgg tccgcgggca      120
gcagggtcgg aggcgagcgg gacaccgcag gctcgcgaag ggcagcggct cacgcacctg      180
agcccggagg agaaagcgct gcggaggaaa ctgaaaaaca gagtagcagc gcagactgct      240
cgagatagaa agaaagcccg gatgagcgcg ctggagcagc aagtgggtga tttggaagaa      300
gagaaccaca aactccagct agaaaatcag cttttacggg agaaaactca cggccttggt      360
gttgagaacc aggagttaag aacacgcttg ggaatggaca cgctggatcc tgacgaggtt      420
ccagaggtgg aggccaaggg gagtggagta aggctggtgg ccgggtctgc tgagtccgca      480
gcaggtgcag gccccagttgt cacctcccca gaacatcttc ccatggactc tgacactggt      540
gcctcttcag attctgagtc tgatatacctt ttgggcattc tggacaagtt ggaccctgtc      600
atgtttttca aatgtccttc cccagagtct gctagtctgg aggaactccc agaggtctac      660
ccagaaggac ctagttcctt accagcctcc ctttctctgt cagtggggac ctcatcagcc      720
aagctggaag ccattaatga actcattcgt tttgaccatg tatacaccaa gcctctagtt      780
ttagagatcc cctctgagac agagagtcaa actaacgtgg tagtgaaaat tgaggaagca      840
cctctaagct cttcagaaga ggatcacctt gaattcattg tctcagtgaa gaaagagcct      900
ttggaagatg acttcatccc agagctgggc atctcaaacc tgctttcatc cagccattgt      960
ctgagaccac cttcttgect gctggacgct cacagtgact gtggatatga gggctcccct     1020
tctcccttca gtgacatgtc ttctccactt ggtacagacc actcctggga ggatactttt     1080
gccaatgaac ttttccccca gctgattagt gtc                                     1113

```

<210> 4

<211> 371

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 4

10

15

20

25

30

35

40

ES 2 673 518 T3

Met Val Val Val Ala Ala Ala Pro Ser Ala Ala Thr Ala Ala Pro Lys
1 5 10 15
Val Leu Leu Leu Ser Gly Gln Pro Ala Ser Gly Gly Arg Ala Leu Pro
20 25 30
Leu Met Val Pro Gly Pro Arg Ala Ala Gly Ser Glu Ala Ser Gly Thr
35 40 45
Pro Gln Ala Arg Lys Arg Gln Arg Leu Thr His Leu Ser Pro Glu Glu
50 55 60
Lys Ala Leu Arg Arg Lys Leu Lys Asn Arg Val Ala Ala Gln Thr Ala
65 70 75 80
Arg Asp Arg Lys Lys Ala Arg Met Ser Glu Leu Glu Gln Gln Val Val
85 90 95
Asp Leu Glu Glu Glu Asn His Lys Leu Gln Leu Glu Asn Gln Leu Leu
100 105 110
Arg Glu Lys Thr His Gly Leu Val Val Glu Asn Gln Glu Leu Arg Thr
115 120 125
Arg Leu Gly Met Asp Thr Leu Asp Pro Asp Glu Val Pro Glu Val Glu
130 135 140
Ala Lys Gly Ser Gly Val Arg Leu Val Ala Gly Ser Ala Glu Ser Ala
145 150 155 160
Ala Gly Ala Gly Pro Val Val Thr Ser Pro Glu His Leu Pro Met Asp
165 170 175
Ser Asp Thr Val Ala Ser Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ile Leu Leu Gly
180 185 190
Ile Leu Asp Lys Leu Asp Pro Val Met Phe Phe Lys Cys Pro Ser Pro
195 200 205
Glu Ser Ala Ser Leu Glu Glu Leu Pro Glu Val Tyr Pro Glu Gly Pro
210 215 220
Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Ser Leu Ser Val Gly Thr Ser Ser Ala
225 230 235 240
Lys Leu Glu Ala Ile Asn Glu Leu Ile Arg Phe Asp His Val Tyr Thr
245 250 255
Lys Pro Leu Val Leu Glu Ile Pro Ser Glu Thr Glu Ser Gln Thr Asn
260 265 270
Val Val Val Lys Ile Glu Glu Ala Pro Leu Ser Ser Ser Glu Glu Asp
275 280 285
His Pro Glu Phe Ile Val Ser Val Lys Lys Glu Pro Leu Glu Asp Asp
290 295 300
Phe Ile Pro Glu Leu Gly Ile Ser Asn Leu Leu Ser Ser Ser His Cys
305 310 315 320
Leu Arg Pro Pro Ser Cys Leu Leu Asp Ala His Ser Asp Cys Gly Tyr
325 330 335
Glu Gly Ser Pro Ser Pro Phe Ser Asp Met Ser Ser Pro Leu Gly Thr
340 345 350
Asp His Ser Trp Glu Asp Thr Phe Ala Asn Glu Leu Phe Pro Gln Leu
355 360 365
Ile Ser Val
370

<210> 5
<211> 801
<212> ADN
5 <213> Mus musculus

<400> 5

ES 2 673 518 T3

atggtggtgg	tggcagcggc	gccgagcgcg	gccacggcgg	cccccaaagt	gctactctta	60
tctggccagc	ccgcctccgg	cggccggggc	ctgccgctca	tggtagccgg	tccgcgggca	120
gcagggtcgg	aggcgagcgg	gacaccgcag	gctcgcgaagc	ggcagcggct	cacgcacctg	180
agcccggagg	agaaagcgct	gcgagaggaa	ctgaaaaaca	gagtagcagc	gcagactgct	240
cgagatagaa	agaaagcccg	gatgagcgcg	ctggagcagc	aagtgggtga	tttgggaagaa	300
gagaaccaca	aactccagct	agaaaatcag	cttttacggg	agaaaactca	cggccttggt	360
gttgagaacc	aggagttaag	aacacgcttg	ggaatggaca	cgctggatcc	tgacgaggtt	420
ccagaggtgg	aggccaaggg	gagtggagta	aggctggtgg	ccgggtctgc	tgagtccgca	480
gcactcagac	tatgtgcacc	tctgcagcag	gtgcaggccc	agttgtcacc	tccccagaac	540
atcttcccat	ggactctgac	actggtgcct	cttcagattc	tgagtctgat	atccttttgg	600
gcattctgga	caagttggac	cctgtcatgt	ttttcaaagt	tccttcccca	gagtctgcta	660
gtctggagga	actcccagag	gtctaccag	aaggacctag	ttccttacca	gcctcccttt	720
ctctgtcagt	ggggacctca	tcagccaagc	tggaagccat	taatgaactc	attcgttttg	780
accatgtata	caccaagcct	c				801

<210> 6

<211> 267

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 6

10

15

20

25

30

35

40

45

ES 2 673 518 T3

Met Val Val Val Ala Ala Ala Pro Ser Ala Ala Thr Ala Ala Pro Lys
 1 5 10 15
 Val Leu Leu Leu Ser Gly Gln Pro Ala Ser Gly Gly Arg Ala Leu Pro
 20 25 30
 Leu Met Val Pro Gly Pro Arg Ala Ala Gly Ser Glu Ala Ser Gly Thr
 35 40 45
 Pro Gln Ala Arg Lys Arg Gln Arg Leu Thr His Leu Ser Pro Glu Glu
 50 55 60
 Lys Ala Leu Arg Arg Lys Leu Lys Asn Arg Val Ala Ala Gln Thr Ala
 65 70 75 80
 Arg Asp Arg Lys Lys Ala Arg Met Ser Glu Leu Glu Gln Gln Val Val
 85 90 95
 Asp Leu Glu Glu Glu Asn His Lys Leu Gln Leu Glu Asn Gln Leu Leu
 100 105 110
 Arg Glu Lys Thr His Gly Leu Val Val Glu Asn Gln Glu Leu Arg Thr
 115 120 125
 Arg Leu Gly Met Asp Thr Leu Asp Pro Asp Glu Val Pro Glu Val Glu
 130 135 140
 Ala Lys Gly Ser Gly Val Arg Leu Val Ala Gly Ser Ala Glu Ser Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Arg Leu Cys Ala Pro Leu Gln Gln Val Gln Ala Gln Leu Ser
 165 170 175
 Pro Pro Gln Asn Ile Phe Pro Trp Thr Leu Thr Leu Leu Pro Leu Gln
 180 185 190
 Ile Leu Ser Leu Ile Ser Phe Trp Ala Phe Trp Thr Ser Trp Thr Leu
 195 200 205
 Ser Cys Phe Ser Asn Val Leu Pro Gln Ser Leu Leu Val Trp Arg Asn
 210 215 220
 Ser Gln Arg Ser Thr Gln Lys Asp Leu Val Pro Tyr Gln Pro Pro Phe
 225 230 235 240
 Leu Cys Gln Trp Gly Pro His Gln Pro Ser Trp Lys Pro Leu Met Asn
 245 250 255

Ser Phe Val Leu Thr Met Tyr Thr Pro Ser Leu
 260 265

<210> 7

5 <211> 504
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 7

10

15

20

ES 2 673 518 T3

```

atggcagctg agtccctgcc tttcaccttg gagacggtgt ccagctggga gctggaagcc      60
tggtatgagg atctgcagga ggtcctgtcc tcagatgaaa atgggggcac ctatatctca      120
tccccaggaa acgaagagga agaatacaaaa accttcaacta ctcttgaccg tgcgtcccta      180
gcttggctga cagaggagcc agggccaaca gaggtcacac gcacatccca aagccctcgc      240
tctccagatt ccagtcagag ttctatggcc caggaggaag aggaggaaga gcaaggaaga      300
actaggaaac ggaaacagag tggtcagtgc ccagcccggc ctgggaagca acgcatgaag      360
gagaaggagc aggagaacga gcggaagtgc gcacagctag ctgaagagaa cgagcggctc      420
aagcaggaaa tcgagcgctt gaccagggag gtggagacca cacggcgggc tctgatcgac      480
cgcatggtea gcctgcacca agca                                          504

```

5 <210> 8
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 8

```

Met Ala Ala Glu Ser Leu Pro Phe Thr Leu Glu Thr Val Ser Ser Trp
1          5          10          15
Glu Leu Glu Ala Trp Tyr Glu Asp Leu Gln Glu Val Leu Ser Ser Asp
          20          25          30
Glu Asn Gly Gly Thr Tyr Ile Ser Ser Pro Gly Asn Glu Glu Glu Glu
          35          40          45
Ser Lys Thr Phe Thr Thr Leu Asp Pro Ala Ser Leu Ala Trp Leu Thr
          50          55          60
Glu Glu Pro Gly Pro Thr Glu Val Thr Arg Thr Ser Gln Ser Pro Arg
65          70          75          80
Ser Pro Asp Ser Ser Gln Ser Ser Met Ala Gln Glu Glu Glu Glu Glu
          85          90          95
Glu Gln Gly Arg Thr Arg Lys Arg Lys Gln Ser Gly Gln Cys Pro Ala
          100          105          110
Arg Pro Gly Lys Gln Arg Met Lys Glu Lys Glu Gln Glu Asn Glu Arg
          115          120          125
Lys Val Ala Gln Leu Ala Glu Glu Asn Glu Arg Leu Lys Gln Glu Ile
          130          135          140
Glu Arg Leu Thr Arg Glu Val Glu Thr Thr Arg Arg Ala Leu Ile Asp
145          150          155          160
Arg Met Val Ser Leu His Gln Ala
          165

```

15 <210> 9
 <211> 1962
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 9

```

atgaagctct ccctggtggc cgcgatgctg ctgctgctca ggcgggcgcg ggccgaggag      60
gaggacaaga aggaggacgt gggcacgggtg gtcggcatcg acctggggac cacctactcc      120

```

20

ES 2 673 518 T3

tgcgtcggcg tgttcaagaa cggccgcgctg gagatcatcg ccaacgatca gggcaaccgc 180
 atcacgccgt cctatgtcgc cttcactcct gaaggggaac gtctgattgg cgatgccgcc 240
 aagaaccagc tcacctccaa ccccgagaac acggctcttg acgccaaagcg gctcatcggc 300
 cgcacgtgga atgaccgctc tgtgcagcag gacatcaagt tcttgccgtt caaggtggtt 360
 gaaaagaaaa ctaaaccata cattcaagtt gatattggag gtgggcaaac aaagacattt 420
 gctcctgaag aaatttctgc catggttctc actaaaatga aagaaaccgc tgaggcttat 480
 ttgggaaaga aggttaccca tgcagttggt actgtaccag cctattttta tgatgcccga 540
 cgccaagcaa ccaaagacgc tggaaactatt gctggcctaa atggttatgag gatcatcaac 600
 gagcctacgg cagctgctat tgcttatggc ctggataaga gggaggggga gaagaacatc 660
 ctgggtgttg acctgggtgg cggaaccttc gatgtgtctc ttctcaccat tgacaatggt 720
 gtcttcgaag ttgtggccac taatggagat actcatctgg gtggagaaga ctttgaccag 780
 cgtgtcatgg aacacttcat caaactgtac aaaaagaaga cgggcaaaga tgtcaggaaa 840
 gacaatagag ctgtgcagaa actccggcgc gaggtagaaa aggccaaacg ggccctgtct 900
 tctcagcatc aagcaagaat tgaattgag tccttctatg aaggagaaga cttttctgag 960
 accctgactc gggccaaatt tgaagagctc aacatggatc tgttccggtc tactatgaag 1020
 cccgtccaga aagtgttgga agattctgat ttgaagaagt ctgatattga tgaattggt 1080
 cttgttggtg gctcgcactc aattccaaag attcagcaac tggttaaaga gttcttcaat 1140
 ggcaaggaac catcccgtgg cataaaccca gatgaagctg tagcgtatgg tgctgctgtc 1200
 caggctggtg tgctctctgg tgatcaagat acaggtgacc tgggtactgct tgatgtatgt 1260
 ccccttacac ttggtattga aactgtggga ggtgtcatga ccaaactgat tccaaggaac 1320
 acagtgggtc ctaccaagaa gtctcagatc ttttctacag cttctgataa tcaaccaact 1380
 gttacaatca aggtctatga aggtgaaaga cccctgacaa aagacaatca tcttctgggt 1440
 acatttgatc tgactggaat tcctcctgct cctcgtgggg tcccacagat tgaagtcacc 1500
 tttgagatag atgtgaatgg tattcttcga gtgacagctg aagacaaggg tacagggaac 1560
 aaaaataaga tcacaatcac caatgaccag aatcgcctga cacctgaaga aatcgaaagg 1620
 atggttaatg atgctgagaa gtttgctgag gaagacaaaa agctcaagga gcgcattgat 1680
 actagaaatg agttggaaag ctatgcctat tctctaaaga atcagattgg agataaagaa 1740
 aagctgggag gtaaaccttc ctctgaagat aaggagacca tggaaaaagc tgtagaagaa 1800
 aagattgaat ggctggaaag ccaccaagat gctgacattg aagacttcaa agctaagaag 1860
 aaggaactgg aagaaattgt tcaaccaatt atcagcaaac tctatggaag tgcaggccct 1920
 cccccaactg gtgaagagga tacagcagaa aaagatgagt tg 1962

<210> 10
 <211> 654
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 10

10

15

20

25

ES 2 673 518 T3

Met	Lys	Leu	Ser	Leu	Val	Ala	Ala	Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Ala	Ala
1				5					10					15	
Arg	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Lys	Lys	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Val	Val	Gly
			20					25					30		
Ile	Asp	Leu	Gly	Thr	Thr	Tyr	Ser	Cys	Val	Gly	Val	Phe	Lys	Asn	Gly
		35					40					45			
Arg	Val	Glu	Ile	Ile	Ala	Asn	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Ile	Thr	Pro	Ser
	50					55					60				
Tyr	Val	Ala	Phe	Thr	Pro	Glu	Gly	Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	Asp	Ala	Ala
65					70					75					80
Lys	Asn	Gln	Leu	Thr	Ser	Asn	Pro	Glu	Asn	Thr	Val	Phe	Asp	Ala	Lys
				85						90				95	
Arg	Leu	Ile	Gly	Arg	Thr	Trp	Asn	Asp	Pro	Ser	Val	Gln	Gln	Asp	Ile
			100					105						110	
Lys	Phe	Leu	Pro	Phe	Lys	Val	Val	Glu	Lys	Lys	Thr	Lys	Pro	Tyr	Ile
		115					120					125			
Gln	Val	Asp	Ile	Gly	Gly	Gly	Gln	Thr	Lys	Thr	Phe	Ala	Pro	Glu	Glu
	130					135					140				
Ile	Ser	Ala	Met	Val	Leu	Thr	Lys	Met	Lys	Glu	Thr	Ala	Glu	Ala	Tyr
145					150					155					160

5

10

15

20

25

30

35

40

ES 2 673 518 T3

Leu	Gly	Lys	Lys	Val	Thr	His	Ala	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ala	Tyr	Phe
				165					170					175	
Asn	Asp	Ala	Gln	Arg	Gln	Ala	Thr	Lys	Asp	Ala	Gly	Thr	Ile	Ala	Gly
			180					185					190		
Leu	Asn	Val	Met	Arg	Ile	Ile	Asn	Glu	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala
		195					200					205			
Tyr	Gly	Leu	Asp	Lys	Arg	Glu	Gly	Glu	Lys	Asn	Ile	Leu	Val	Phe	Asp
	210					215					220				
Leu	Gly	Gly	Gly	Thr	Phe	Asp	Val	Ser	Leu	Leu	Thr	Ile	Asp	Asn	Gly
225					230						235				240
Val	Phe	Glu	Val	Val	Ala	Thr	Asn	Gly	Asp	Thr	His	Leu	Gly	Gly	Glu
				245					250					255	
Asp	Phe	Asp	Gln	Arg	Val	Met	Glu	His	Phe	Ile	Lys	Leu	Tyr	Lys	Lys
			260					265					270		
Lys	Thr	Gly	Lys	Asp	Val	Arg	Lys	Asp	Asn	Arg	Ala	Val	Gln	Lys	Leu
		275						280				285			
Arg	Arg	Glu	Val	Glu	Lys	Ala	Lys	Arg	Ala	Leu	Ser	Ser	Gln	His	Gln
	290					295						300			
Ala	Arg	Ile	Glu	Ile	Glu	Ser	Phe	Tyr	Glu	Gly	Glu	Asp	Phe	Ser	Glu
305					310						315				320
Thr	Leu	Thr	Arg	Ala	Lys	Phe	Glu	Glu	Leu	Asn	Met	Asp	Leu	Phe	Arg
				325							330				335
Ser	Thr	Met	Lys	Pro	Val	Gln	Lys	Val	Leu	Glu	Asp	Ser	Asp	Leu	Lys
			340					345					350		
Lys	Ser	Asp	Ile	Asp	Glu	Ile	Val	Leu	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg	Ile
		355					360					365			
Pro	Lys	Ile	Gln	Gln	Leu	Val	Lys	Glu	Phe	Phe	Asn	Gly	Lys	Glu	Pro
	370					375					380				
Ser	Arg	Gly	Ile	Asn	Pro	Asp	Glu	Ala	Val	Ala	Tyr	Gly	Ala	Ala	Val
385					390						395				400
Gln	Ala	Gly	Val	Leu	Ser	Gly	Asp	Gln	Asp	Thr	Gly	Asp	Leu	Val	Leu
			405							410				415	
Leu	Asp	Val	Cys	Pro	Leu	Thr	Leu	Gly	Ile	Glu	Thr	Val	Gly	Gly	Val
			420					425					430		
Met	Thr	Lys	Leu	Ile	Pro	Arg	Asn	Thr	Val	Val	Pro	Thr	Lys	Lys	Ser
		435					440					445			
Gln	Ile	Phe	Ser	Thr	Ala	Ser	Asp	Asn	Gln	Pro	Thr	Val	Thr	Ile	Lys
	450					455					460				
Val	Tyr	Glu	Gly	Glu	Arg	Pro	Leu	Thr	Lys	Asp	Asn	His	Leu	Leu	Gly
465					470						475				480
Thr	Phe	Asp	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Val	Pro	Gln
				485						490				495	
Ile	Glu	Val	Thr	Phe	Glu	Ile	Asp	Val	Asn	Gly	Ile	Leu	Arg	Val	Thr
			500					505					510		
Ala	Glu	Asp	Lys	Gly	Thr	Gly	Asn	Lys	Asn	Lys	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn
		515					520					525			
Asp	Gln	Asn	Arg	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Ile	Glu	Arg	Met	Val	Asn	Asp
	530					535					540				
Ala	Glu	Lys	Phe	Ala	Glu	Glu	Asp	Lys	Lys	Leu	Lys	Glu	Arg	Ile	Asp
545					550						555				560
Thr	Arg	Asn	Glu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ala	Tyr	Ser	Leu	Lys	Asn	Gln	Ile
				565						570				575	
Gly	Asp	Lys	Glu	Lys	Leu	Gly	Gly	Lys	Leu	Ser	Ser	Glu	Asp	Lys	Glu
			580					585					590		
Thr	Met	Glu	Lys	Ala	Val	Glu	Glu	Lys	Ile	Glu	Trp	Leu	Glu	Ser	His
		595					600					605			
Gln	Asp	Ala	Asp	Ile	Glu	Asp	Phe	Lys	Ala	Lys	Lys	Lys	Glu	Leu	Glu
	610					615						620			
Glu	Ile	Val	Gln	Pro	Ile	Ile	Ser	Lys	Leu	Tyr	Gly	Ser	Ala	Gly	Pro
625					630						635				640

ES 2 673 518 T3

Pro Pro Thr Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Lys Asp Glu Leu
645 650

5 <210> 11
<211> 783
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 11

atggtggtgg	tggcagccgc	gccgaacccg	gccgacggga	cccctaaagt	tctgcttctg	60
tcggggcagc	ccgcctccgc	cgccggagcc	cgggccggcc	aggccctgcc	gctcatggtg	120
ccagcccaga	gaggggcccag	cccggaggca	gcgagcgggg	ggctgccccca	ggcgcgcaag	180
cgacagcgcc	tcacgcacct	gagccccgag	gagaaggcgc	tgaggaggaa	actgaaaaac	240
agagtagcag	ctcagactgc	cagagatcga	aagaaggctc	gaatgagtga	gctggaacag	300
caagtggtag	atrtagaaga	agagaaccaa	aaacttttgc	tagaaaatca	gctttttacga	360
gagaaaactc	atggccttgt	agttgagaac	caggagttaa	gacagcgctt	ggggatggat	420
gccctggttg	ctgaagagga	ggcggaaagcc	aaggggaatg	aagtgaggcc	agtggccggg	480
tctgctgagt	ccgcagcact	cagactacgt	gcacctctgc	agcagggtgca	ggcccagttg	540
tcaccctcc	agaacatctc	cccatggatt	ctggcggtat	tgactcttca	gattcagagt	600
ctgatatcct	gttgggcatt	ctggacaact	tggaccagc	catgttcttc	aatgccctt	660
ccccagagcc	tgccagcctg	gaggagctcc	cagaggtcta	cccagaagga	cccagttcct	720
taccagcctc	ccttttctctg	tcagtgggga	cgtcatcagc	caagctggaa	gccattaatg	780

10 aac 783

<210> 12
<211> 261
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens

<400> 12

20

25

30

35

40

45

ES 2 673 518 T3

Met Val Val Val Ala Ala Ala Pro Asn Pro Ala Asp Gly Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Val Leu Leu Leu Ser Gly Gln Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ala Pro Ala
 20 25 30
 Gly Gln Ala Leu Pro Leu Met Val Pro Ala Gln Arg Gly Ala Ser Pro
 35 40 45
 Glu Ala Ala Ser Gly Gly Leu Pro Gln Ala Arg Lys Arg Gln Arg Leu
 50 55 60
 Thr His Leu Ser Pro Glu Glu Lys Ala Leu Arg Arg Lys Leu Lys Asn
 65 70 75 80
 Arg Val Ala Ala Gln Thr Ala Arg Asp Arg Lys Lys Ala Arg Met Ser
 85 90 95
 Glu Leu Glu Gln Gln Val Val Asp Leu Glu Glu Glu Asn Gln Lys Leu
 100 105 110
 Leu Leu Glu Asn Gln Leu Leu Arg Glu Lys Thr His Gly Leu Val Val
 115 120 125
 Glu Asn Gln Glu Leu Arg Gln Arg Leu Gly Met Asp Ala Leu Val Ala
 130 135 140
 Glu Glu Glu Ala Glu Ala Lys Gly Asn Glu Val Arg Pro Val Ala Gly
 145 150 155 160
 Ser Ala Glu Ser Ala Ala Leu Arg Leu Arg Ala Pro Leu Gln Gln Val
 165 170 175
 Gln Ala Gln Leu Ser Pro Leu Gln Asn Ile Ser Pro Trp Ile Leu Ala
 180 185 190
 Val Leu Thr Leu Gln Ile Gln Ser Leu Ile Ser Cys Trp Ala Phe Trp
 195 200 205
 Thr Thr Trp Thr Gln Ser Cys Ser Ser Asn Ala Leu Pro Gln Ser Leu
 210 215 220
 Pro Ala Trp Arg Ser Ser Gln Arg Ser Thr Gln Lys Asp Pro Val Pro
 225 230 235 240
 Tyr Gln Pro Pro Phe Leu Cys Gln Trp Gly Arg His Gln Pro Ser Trp
 245 250 255
 Lys Pro Leu Met Asn
 260

5 <210> 13
 <211> 1386
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 13

15

20

ES 2 673 518 T3

atggcctcaa	acgattatac	ccaacaagca	acccaaagct	atggggccta	ccccaccag	60
cccgggcagg	gctattccca	gcagagcagt	cagccctacg	gacagcagag	ttacagtggg	120
tatagccagt	ccacggacac	ttcaggctat	ggccagagca	gctattcttc	ttatggccag	180
agccagaaca	caggctatgg	aactcagtca	actccccagg	gatatggctc	gactggcggc	240
tatggcagta	gccagagctc	ccaatcgtct	tacgggcagc	agtcctccta	ccctggctat	300
ggccagcagc	cagctcccag	cagcacctcg	ggaagttagc	gtagcagttc	tcagagcagc	360
agctatgggc	agccccagag	tgggagctac	agccagcagc	ctagctatgg	tggacagcag	420
caaagctatg	gacagcagca	aagctataat	ccccctcagg	gctatggaca	gcagaaccag	480
tacaacagca	gcagtgggtg	tggaggtgga	ggtggagggtg	gaggtaacta	tggccaagat	540
caatcctcca	tgagttagtg	tgggtggcagt	ggtggcggtt	atggcaatca	agaccagagt	600
ggtggagggtg	gcagcgggtg	ctatggacag	caggaccgtg	gaggcccgcg	caggggtggc	660
agtgggtggcg	gcggcggcgg	cggcggtggt	ggttacaacc	gcagcagttg	tggctatgaa	720
cccagaggtc	gtggagggtg	ccgtggaggc	agaggtggca	tgggcggaag	tgaccgtggt	780
ggcttcaata	aatttgggtg	gttcaagaag	gaagtgtatc	ttcatacatc	accacacctg	840
aaagcagatg	tgcttttcca	gactgatcca	actgcagaga	tggcagctga	gtcattgcct	900
ttctccttcg	ggacactgtc	cagctgggag	ctggaagcct	ggtatgagga	cctgcaagag	960
gtcctgtctt	cagatgaaaa	tgggggtacc	tatgtttcac	ctcctggaaa	tgaagaggaa	1020
gaatcaaaaa	tcttcaccac	tcttgaccct	gcttctctgg	cttggctgac	tgaggaggag	1080
ccagaaccag	cagaggtcac	aagcacctcc	cagagccctc	actctccaga	ttccagtcag	1140
agctccctgg	ctcaggagga	agaggaggaa	gaccaaggga	gaaccaggaa	acggaaacag	1200
agtggtcatt	cccagcccg	ggctggaaag	cagcgcattg	aggagaaaga	acaggagaa	1260
gaaaggaaag	tggcacagct	agctgaagag	aatgaacggc	tcaagcagga	aatcgagcgc	1320
ctgaccaggg	aagtagaggc	gactcgccga	gctctgattg	accgaatggt	gaatctgcac	1380
caagca						1386

<210> 14

<211> 462

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

10

15

20

25

30

35

ES 2 673 518 T3

Met	Ala	Ser	Asn	Asp	Tyr	Thr	Gln	Gln	Ala	Thr	Gln	Ser	Tyr	Gly	Ala
1				5					10					15	
Tyr	Pro	Thr	Gln	Pro	Gly	Gln	Gly	Tyr	Ser	Gln	Gln	Ser	Ser	Gln	Pro
			20					25					30		
Tyr	Gly	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Ser	Gln	Ser	Thr	Asp	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Tyr	Gly	Gln	Ser	Ser	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Gly	Gln	Ser	Gln	Asn	Thr
	50					55					60				
Gly	Tyr	Gly	Thr	Gln	Ser	Thr	Pro	Gln	Gly	Tyr	Gly	Ser	Thr	Gly	Gly
65					70					75					80
Tyr	Gly	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Tyr	Gly	Gln	Gln	Ser	Ser

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

ES 2 673 518 T3

				85					90					95		
Tyr	Pro	Gly	Tyr	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Pro	Ser	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	
				100				105					110			
Tyr	Gly	Ser	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Ser	Tyr	Gly	Gln	Pro	Gln	Ser	Gly	
		115					120					125				
Ser	Tyr	Ser	Gln	Gln	Pro	Ser	Tyr	Gly	Gly	Gln	Gln	Gln	Ser	Tyr	Gly	
		130				135					140					
Gln	Gln	Gln	Ser	Tyr	Asn	Pro	Pro	Gln	Gly	Tyr	Gly	Gln	Gln	Asn	Gln	
145					150					155					160	
Tyr	Asn	Ser	Ser	Ser	Gly	Asn										
				165						170					175	
Tyr	Gly	Gln	Asp	Gln	Ser	Ser	Met	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
			180					185					190			
Gly	Tyr	Gly	Asn	Gln	Asp	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Tyr	
		195					200					205				
Gly	Gln	Gln	Asp	Arg	Gly	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
		210				215						220				
Gly	Tyr	Asn	Arg	Ser	Ser	Gly	Gly	Tyr	Glu							
225					230					235					240	
Pro	Arg	Gly	Arg	Gly	Gly	Gly	Arg	Gly	Gly	Arg	Gly	Gly	Met	Gly	Gly	
				245						250				255		
Ser	Asp	Arg	Gly	Gly	Phe	Asn	Lys	Phe	Gly	Val	Phe	Lys	Lys	Glu	Val	
			260					265						270		
Tyr	Leu	His	Thr	Ser	Pro	His	Leu	Lys	Ala	Asp	Val	Leu	Phe	Gln	Thr	
		275					280					285				
Asp	Pro	Thr	Ala	Glu	Met	Ala	Ala	Glu	Ser	Leu	Pro	Phe	Ser	Phe	Gly	
		290				295					300					
Thr	Leu	Ser	Ser	Trp	Glu	Leu	Glu	Ala	Trp	Tyr	Glu	Asp	Leu	Gln	Glu	
305					310						315				320	
Val	Leu	Ser	Ser	Asp	Glu	Asn	Gly	Gly	Thr	Tyr	Val	Ser	Pro	Pro	Gly	
				325						330				335		
Asn	Glu	Glu	Glu	Glu	Ser	Lys	Ile	Phe	Thr	Thr	Leu	Asp	Pro	Ala	Ser	
			340					345					350			
Leu	Ala	Trp	Leu	Thr	Glu	Glu	Glu	Pro	Glu	Pro	Ala	Glu	Val	Thr	Ser	
		355					360					365				
Thr	Ser	Gln	Ser	Pro	His	Ser	Pro	Asp	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Leu	Ala	
		370				375					380					
Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Gln	Gly	Arg	Thr	Arg	Lys	Arg	Lys	Gln	
385					390					395					400	
Ser	Gly	His	Ser	Pro	Ala	Arg	Ala	Gly	Lys	Gln	Arg	Met	Lys	Glu	Lys	
				405					410					415		
Glu	Gln	Glu	Asn	Glu	Arg	Lys	Val	Ala	Gln	Leu	Ala	Glu	Glu	Asn	Glu	
			420					425					430			
Arg	Leu	Lys	Gln	Glu	Ile	Glu	Arg	Leu	Thr	Arg	Glu	Val	Glu	Ala	Thr	
		435				440						445				
Arg	Arg	Ala	Leu	Ile	Asp	Arg	Met	Val	Asn	Leu	His	Gln	Ala			
		450				455						460				

ES 2 673 518 T3

<210> 15
<211> 49
<212> ADN
5 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica un ARN pequeño de interferencia de horquillado corto que está dirigido a transcritos de CHOP.
10

<400> 15
acgaagagga agaatcaaat tcaagagatt tgattcttc tcttcgtt 49

<210> 16
15 <211> 49
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
20 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica un ARN pequeño de interferencia de horquillado corto que está dirigido a transcritos de CHOP.

<400> 16
25 gaactaggaa acggaacat tcaagagatg ttccgtttc ctagtctt 49

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5
1. Un método para aumentar la tasa o ritmo de secreción celular de una proteína, que comprende los siguientes pasos:
- 10
- a) modular o regular la actividad de al menos un componente de la ruta de respuesta a proteínas desplegadas (o UPR, por sus siglas en inglés) en una célula; y
 - b) cultivar las células,
- de manera que el componente de la vía o ruta UPR es una CHOP y de manera que la actividad de la CHOP se modula transfectando establemente la célula con un ácido nucleico que codifica un ARN pequeño de interferencia (ARNip o siRNA, por sus siglas en inglés) que está dirigido a los transcritos (o transcriptos) de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CHOP, de manera que el ácido nucleico que codifica el siRNA es la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16.
- 15
2. El método de la reivindicación 1, de manera que la célula es una célula de mieloma.
3. El método de la reivindicación 2, de manera que la célula de mieloma es Sp2/0, NSO, FO o Ag653.
- 20
4. El método de la reivindicación 2, de manera que la célula de mieloma es un subclón de Sp2/0, NSO, FO o Ag653.
5. El método de la reivindicación 1, de manera que la célula es una célula de ovario de hámster chino (o célula CHO).
- 25
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, de manera que la proteína es un anticuerpo.
7. El método de la reivindicación 1, de manera que la proteína CHOP tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 8.
- 30
8. Una célula plasmática que se obtiene modulando o regulando la actividad de la CHOP en la célula mediante un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, de manera que la célula plasmática está transflectada establemente con un ácido nucleico que codifica un ARN pequeño de interferencia (siRNA) que está dirigido a los transcritos de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CHOP, de manera que el ácido nucleico que codifica el siRNA es la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16.
- 35
9. La célula plasmática de la reivindicación 8, que es una célula derivada de SP2/0.
- 40
10. La célula plasmática de la reivindicación 9, que
- a) secreta un anticuerpo; y/o
 - b) es una célula C2-8 o C2-18.

45

50

55

60

65

Fig. 1

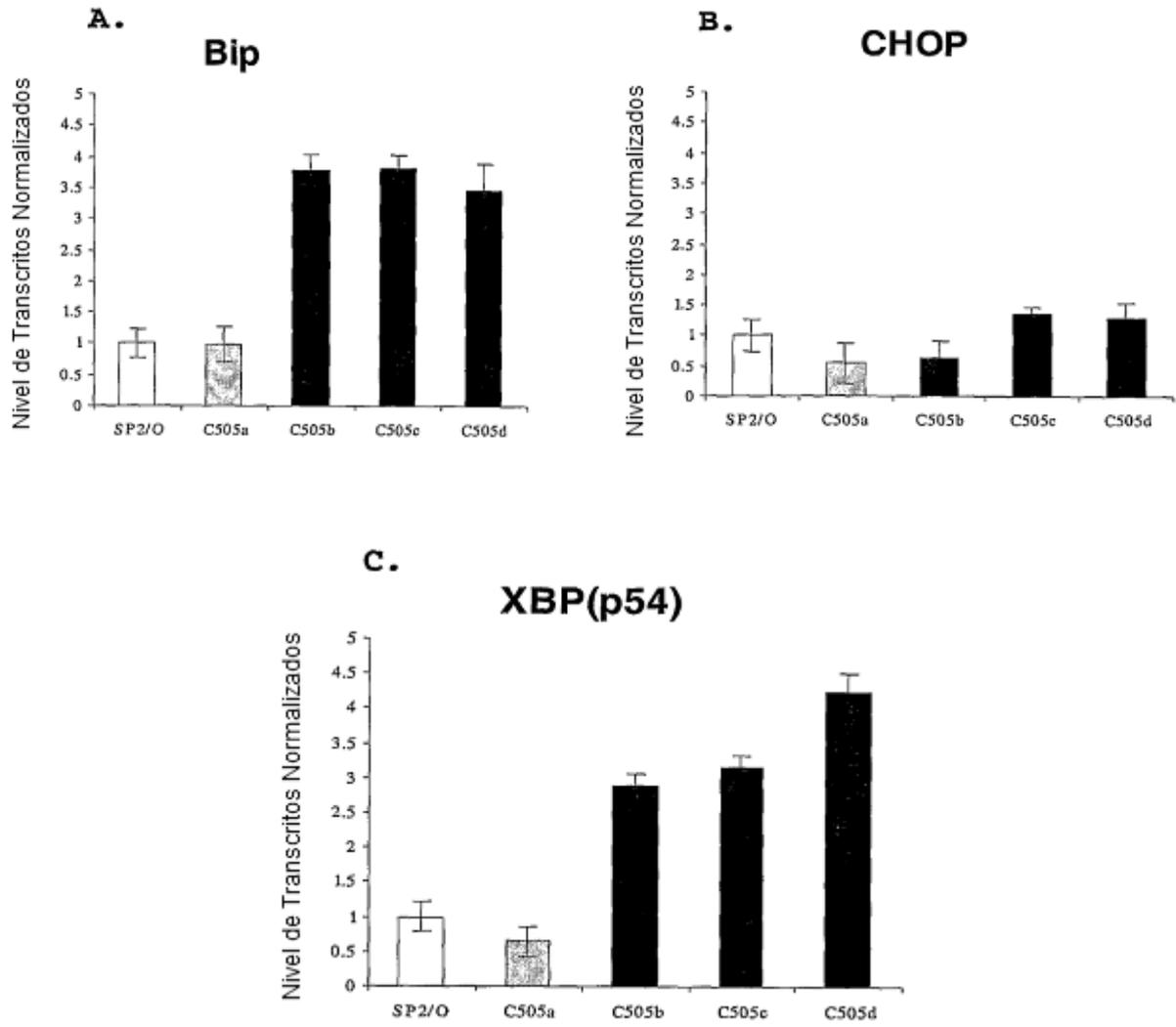
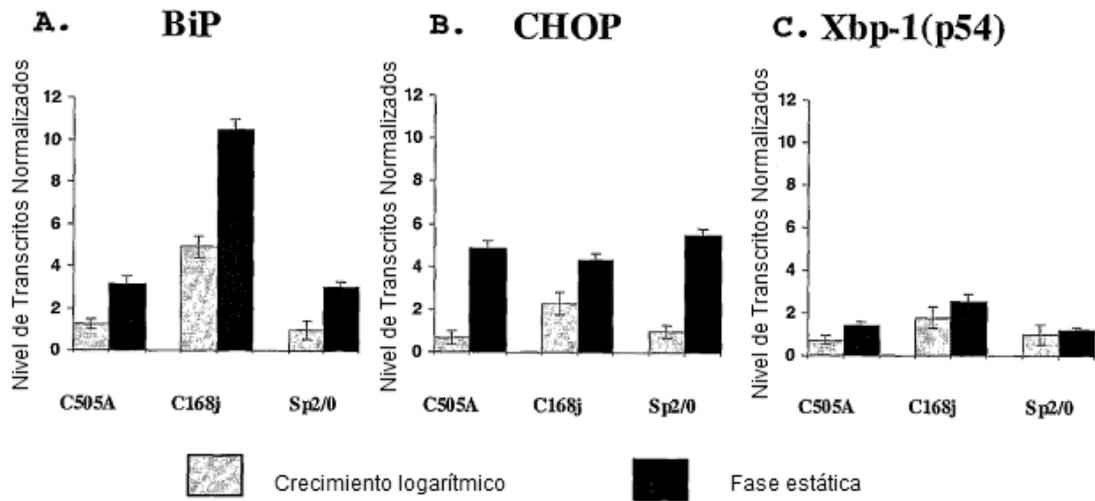


Fig. 2



D.



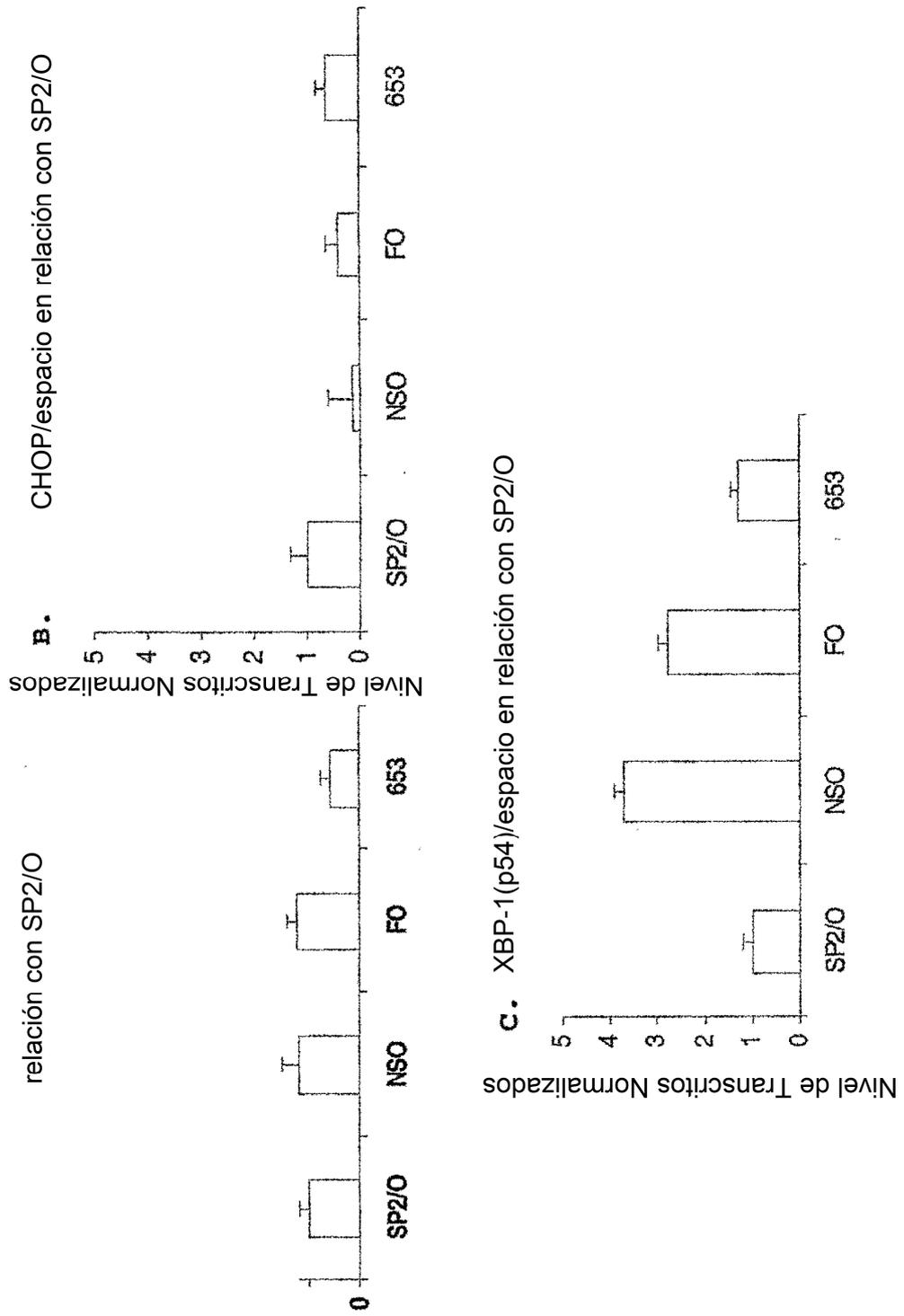


Fig. 3

Fig. 4

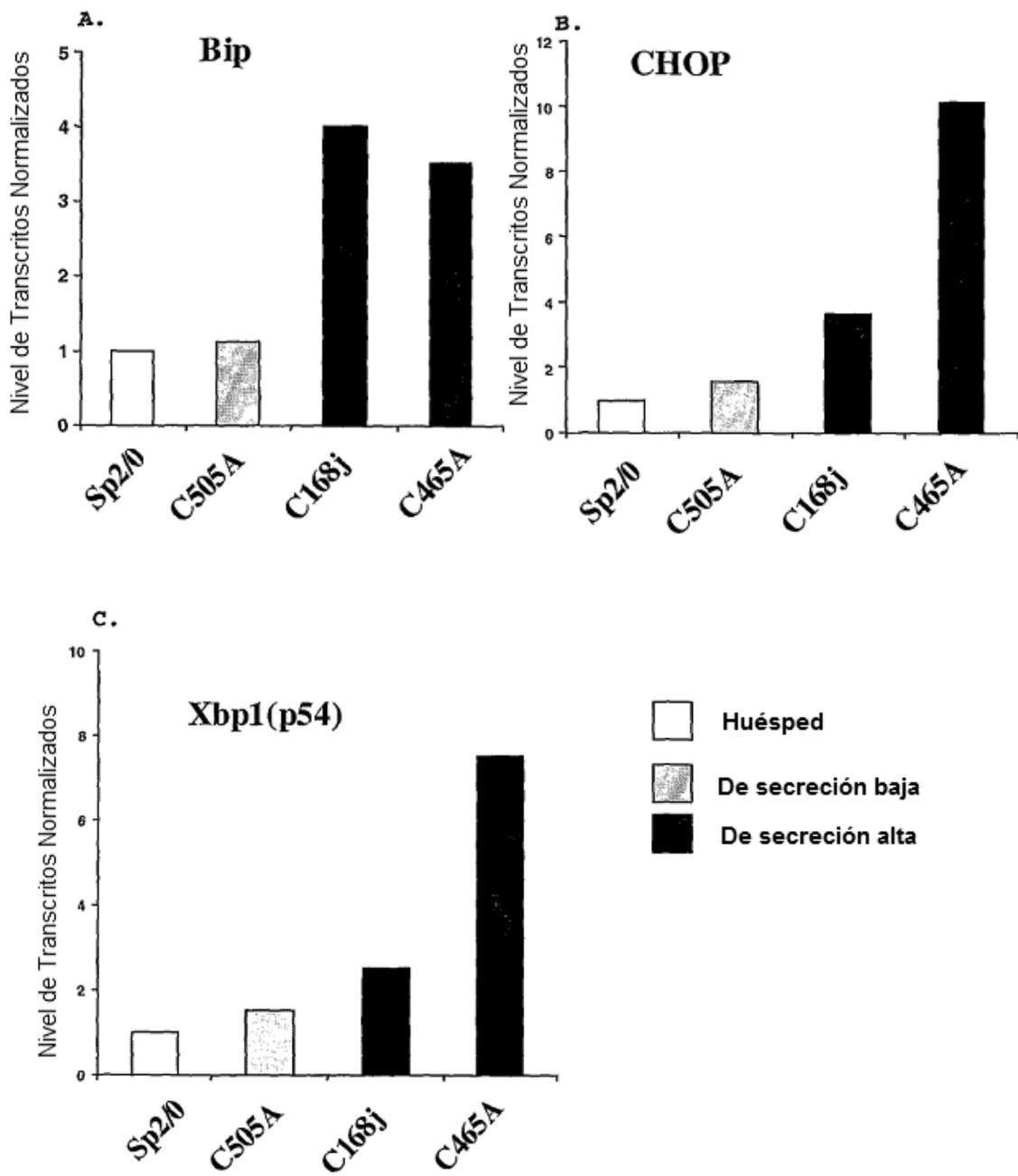


Fig. 5

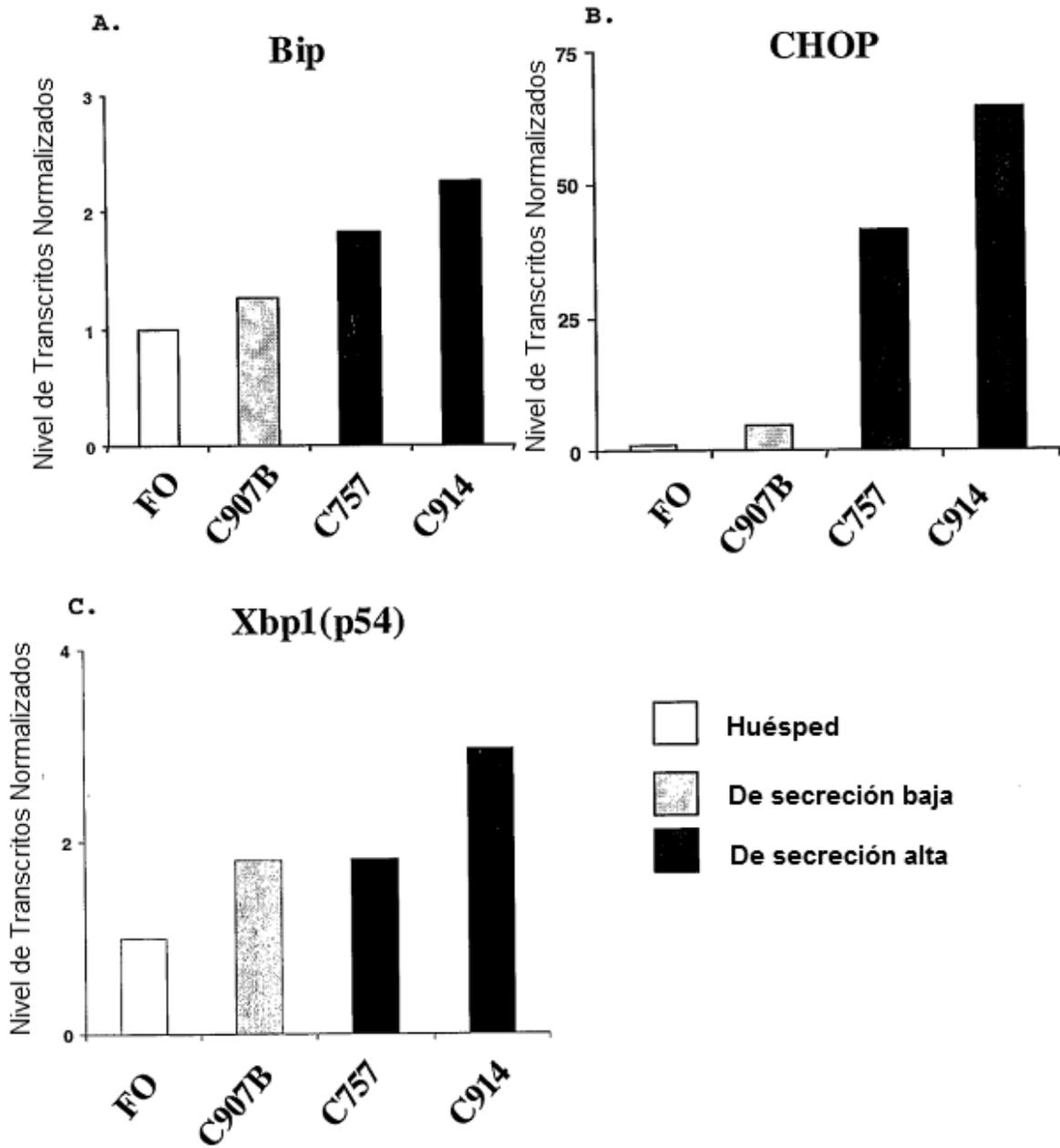


Fig. 6

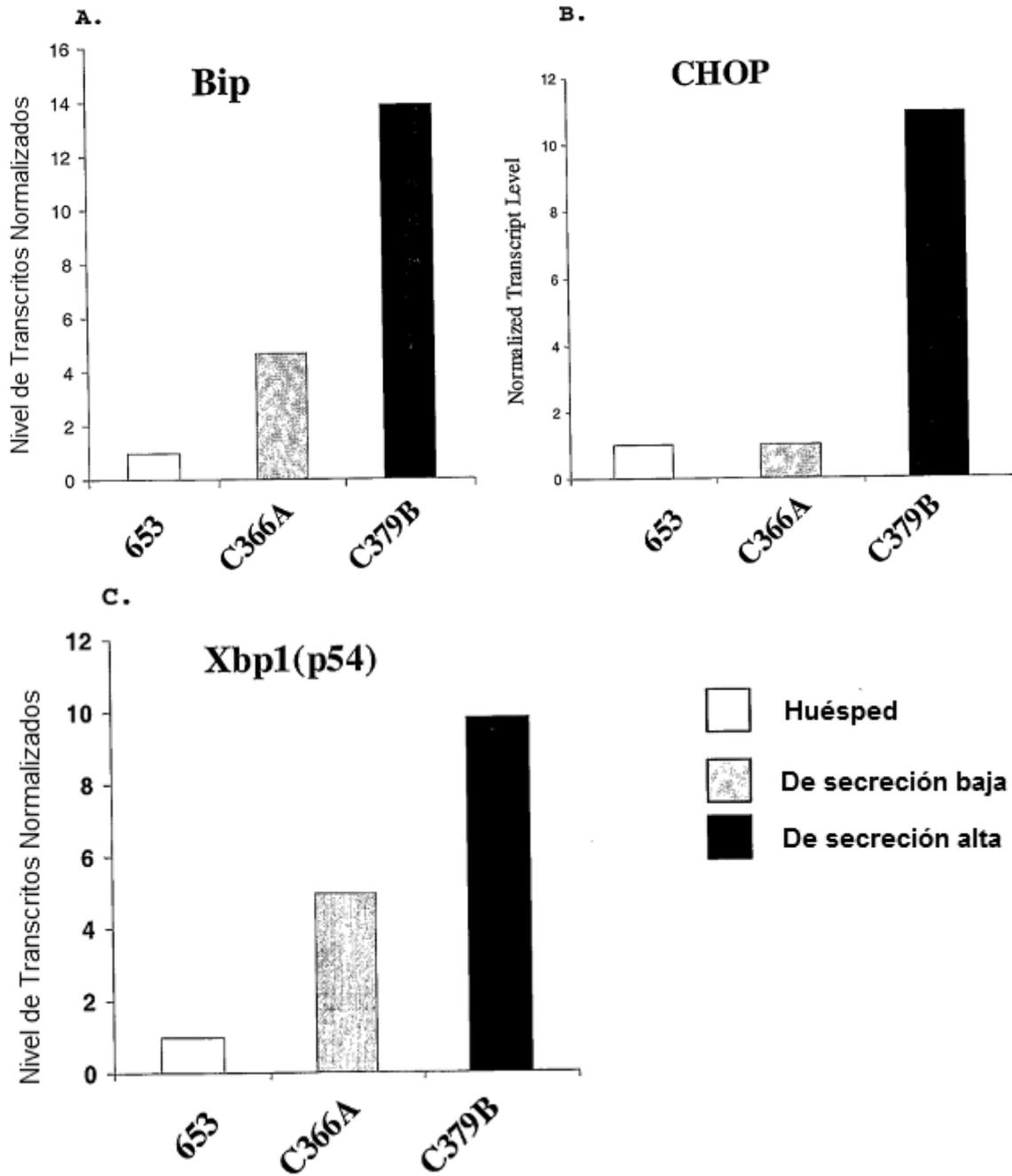


Fig. 7

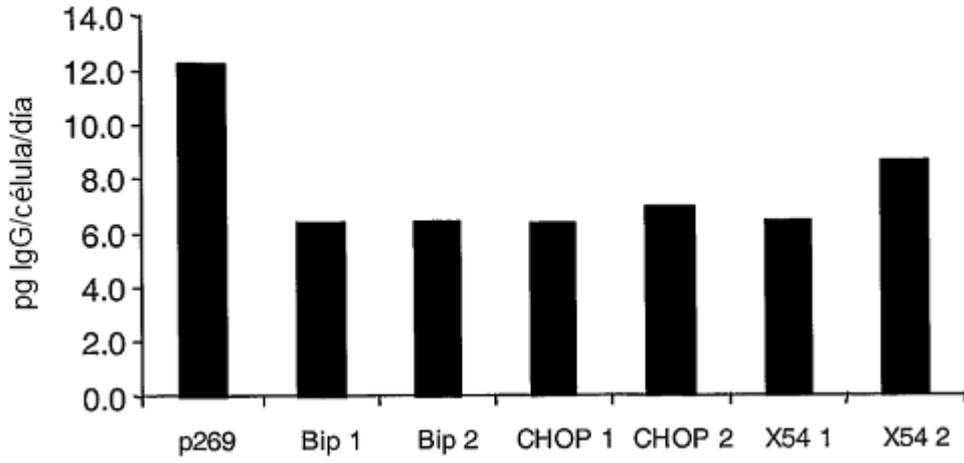


Fig. 8

